



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI RNA DAN PENGKLONAN GEN TRIPSIN KATION  
DARI PANKREAS SAPI KE *Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

**SKRIPSI**

**ANNISA  
0806327124**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI RNA DAN PENGKLONAN GEN TRIPSIN KATION  
DARI PANKREAS SAPI KE *Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**ANNISA  
0806327124**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Annisa

NPM : 0806327124

Tanda Tangan : 

Tanggal : 20 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Annisa  
NPM : 0806327124  
Program Studi : S1 Biologi  
Judul Skripsi : Isolasi RNA dan Pengklonaan Gen Tripsin Kation  
dari Pankreas Sapi ke *Escherichia coli* DH5a

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr.rer.nat. Astutiati Nurhasanah (.....)  
Pembimbing II : Dr. Abinawanto (.....)  
Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo (.....)  
Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbila'lamiin, segala puji dan syukur bagi Allah SWT atas berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah untuk Nabi Muhammad SAW, sang rahmat bagi seluruh alam. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI). Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. rer.nat. Astutiati Nurhasanah dan Dr. Abinawanto selaku pembimbing I dan II yang telah membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, motivasi, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo dan Dr. Anom Bowolaksono selaku penguji I dan II, dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku ketua sidang atas saran dan perbaikan-perbaikan, dukungan, dan doa yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi.
3. Ariyanti Oetari, Ph.D selaku Pembimbing Akademis atas segala saran-saran bimbingannya dan dukungan yang diberikan.
4. Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI dan Dra.Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, Dr. Wibowo Mangunwardoyo dan Dra. Setiorini, M.Kes selaku Koordinator Seminar Departemen Biologi FMIPA UI.
5. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi FMIPA UI. Terima kasih pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, Pak Taryana dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.

6. Dr. Agus Masduki selaku Direktur Bioindustri BPPT yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian. Terimakasih juga kepada Dr. Is Helianti selaku Kepala Laboratorium Biologi Molekular Non-Virus BPPT dan Dr. Niknik Nurhayati selaku staf Biologi Molekular Non-Virus BPPT yang telah memberikan sambutan hangat dan dukungan kepada penulis.
7. Segenap staf laboratorium Biologi Molekular Non-Virus BPPT, Mbak Mumu, Mbak Lina, Kak Shafa, dan Mbak Keis atas motivasi, bimbingan, ilmu, dan keceriaan yang diberikan selama penelitian. Terimakasih pula kepada seluruh staf, peneliti, dan teman-teman di laboratorium Bioindustri BPPT, atas bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
8. Keluarga tercinta, Papa (Ace Aladin), Mama (Isfiandiary) atas doa, cinta, kasih sayang, dukungan, dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis. Rasa terimakasih yang sama untuk Kakakku (Tarro, Boninno, Cesar, Daniel, Erick, dan Faisal).
9. Terimakasih kepada Annisa Fauziah, Nur El Fadhila, Rithami Arita, Mien Saviera, Putri Krida, Rininta Dwi, Maya Ulfah, Seyla Fenina, Dessy, Wina, Dyfi, Balqis, Puji, Sintia, Atif, Refvi, dan seluruh teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, serta untuk teman-teman BIOSENTRIS 08 yang telah berbagi kenangan indah bersama.

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. *Barangsiapa yang berjalan menuntut ilmu, maka Allah akan memudahkan baginya jalan menuju surga.* Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

**Penulis**

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annisa  
NPM : 0806327124  
Program Studi : S1  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Isolasi RNA dan Pengklonaan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ”

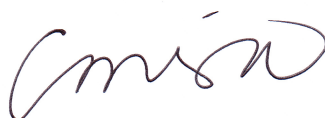
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 20 Juni 2012

Yang menyatakan



( Annisa )

vii

## ABSTRAK

Nama : Annisa  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul : Isolasi RNA dan Pengklonan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Tripsin kation memiliki peran penting dalam teknik kultur sel mamalia *adherent*. Enzim tersebut berperan sebagai enzim hidrolitik yang berfungsi untuk mendispersi sel yang melekat pada cawan petri atau botol tempat kulturnya sehingga mempermudah proses kultur sel mamalia baik pada proses pemanenan sel maupun subkultur. Penelitian bertujuan untuk mengisolasi dan mengklon gen tripsin kation dari pankreas sapi ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan vektor pGEM-T Easy. Fragmen gen tripsin kation target berukuran 780 pb diamplifikasi dari cDNA yang berasal dari mRNA sel pankreas sapi dengan primer spesifik gen tripsin kation. Gen tripsin kation target diligasi pada plasmid pGEM-T Easy. Vektor rekombinan ditransformasi dengan metode kejutan panas pada sel *E. coli* DH5 $\alpha$  dan diseleksi menggunakan medium ampisilin. Vektor rekombinan di digesti menggunakan enzim *SfoI* dan *XmaI* dan menghasilkan pita DNA berukuran 780 pb pada elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan gen tripsin kation telah berhasil diklon ke dalam plasmid pGEM-T Easy.

Kata kunci : cDNA, *E. coli* DH5 $\alpha$ , mRNA, tripsin kation, pGEM-T Easy.

xiii + 65 halaman; 14 gambar; 9 lampiran; 7 tabel

Daftar referensi : 57 (1939--2012)



## ABSTRACT

Name : Annisa  
Program Study : S1 Biology Regular  
Title : RNA Isolation and Gene Cloning of Bovine Pancreatic Trypsin  
Cation into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Cationic trypsin has an important role in adherent mammalian cell culture. The enzyme is a hydrolytic enzyme that disperses the cells attached to petri dishes and culture bottle making the harvesting and subculturing procedures easier. This research aims to isolate the RNA and clone the bovine pancreatic cationic trypsin gene into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The 780 bp cationic trypsin gene was amplified from cDNA derived from mRNA isolated from bovine pancreas using cationic trypsin gene-specific primers. Cationic trypsin gene was ligated to pGEM-T Easy plasmid. Recombinant vector was transformed by heat shock method into *E. coli* DH5 $\alpha$  cells, which were then selected using ampicillin containing medium. The recombinant vector was digested using enzymes *Sfo*I and *Xma*I to confirm the presence of the target gene. Agarose gel electrophoresis showed a 780 bp DNA band, confirming that the cationic trypsin gene was successfully cloned into the plasmid pGEM-T Easy.

Keywords : cationic trypsin, cDNA, *E. coli* DH5 $\alpha$ , mRNA, pGEM-T Easy.

9 appendices; xiii + 65 pages; 14 pictures; 7 tables

Bibliography : 57 (1939--2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Gen tripsin kation .....	3
2.2 Isolasi RNA .....	4
2.3 Pengklonaan .....	6
2.3.1 Pengertian pengklonaan gen.....	6
2.3.2 Komponen pengklonaan.....	6
2.3.2.1 Sumber DNA .....	6
2.3.2.2 Vektor pGEM-T Easy.....	7
2.3.2.3 Enzim restriksi.....	8
2.3.2.4 Enzim ligase .....	8
2.3.2.5 Sel inang <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	9
2.4 <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	9
2.5 Elektroforesis.....	12
2.6 Transformasi DNA rekombinan pada sel inang .....	12
2.7 <i>Screening</i> .....	13
2.8 Sekuensing DNA dan analisis hasil sekuensing.....	13
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
3.1 Lokasi dan waktu penelitian.....	15
3.2 Bahan.....	15
3.2.1 Sampel.....	15
3.2.2 Vektor.....	15
3.2.3 Kultur sel inang .....	15
3.2.4 Bahan kimia.....	15
3.3 Alat .....	16
3.4 Skema kerja penelitian .....	17
3.5 Cara kerja .....	18
3.5.1 Pembuatan larutan/ <i>buffer</i> .....	18
3.5.2 Pembuatan medium .....	18
3.5.3 Isolasi RNA pankreas sapi .....	18

3.5.4	Pemisahan fragmen RNA dengan elektroforesis gel agarosa ..	19
3.5.5	<i>Reverse transcription</i> PCR (RT-PCR) .....	20
3.5.6	Elektroforesis .....	23
3.5.7	Purifikasi produk PCR .....	23
3.5.8	Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA.....	24
3.5.9	<i>A-tailing</i> dan ligasi .....	24
3.5.10	Pembuatan sel kompeten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	25
3.5.11	Transformasi DNA rekombinan pada sel inang.....	25
3.5.12	Isolasi plasmid rekombinan.....	26
3.5.13	Verifikasi DNA rekombinan dengan digesti.....	27
3.5.14	Purifikasi plasmid rekombinan.....	27
3.5.15	Sekuensing dan analisis hasil sekuensing .....	28
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>29</b>
4.1	Hasil.....	29
4.1.1	Isolasi RNA pankreas sapi .....	29
4.1.2	<i>Reverse transcription</i> PCR (RT-PCR) .....	30
4.1.3	Purifikasi PCR gen tripsin kation.....	30
4.1.4	<i>A-tailing</i> dan ligasi gen tripsin kation .....	31
4.1.5	Transformasi vektor rekombinan pada sel <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	31
4.1.6	Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti .....	33
4.1.7	Purifikasi plasmid rekombinan.....	34
4.1.8	Sekuensing dan analisis hasil sekuensing .....	35
4.1.9	Konstruksi plasmid rekombinan pGEM-T Easy tripsin kation .....	35
4.2	Pembahasan .....	36
4.2.1	Isolasi RNA pankreas sapi .....	36
4.2.2	Visualisasi sampel RNA total pada gel agarosa 1% yang mengandung formaldehid 2,2M.....	37
4.2.3	<i>Reverse transcription</i> PCR (RT-PCR) .....	38
4.2.4	Purifikasi PCR gen tripsin kation.....	39
4.2.5	<i>A-tailing</i> dan ligasi gen tripsin kation .....	40
4.2.6	Transformasi plasmid rekombinan ke dalam <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ....	40
4.2.7	Isolasi plasmid rekombinan.....	41
4.2.8	Verifikasi plasmid DNA rekombinan dengan digesti .....	42
4.2.9	Purifikasi plasmid rekombinan .....	42
4.2.10	Sekuensing dan analisis hasil sekuensing.....	43
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>45</b>
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran .....	45
	<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema pemotongan tripsin .....	3
Gambar 2.2	Pemisahan RNA dari molekul protein dan DNA di bawah kondisi asam .....	5
Gambar 2.3.2.2	Vektor pGEM-T Easy .....	7
Gambar 2.4	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) .....	11
Gambar 3.4	Skema kerja penelitian .....	17
Gambar 4.1.1	Visualisasi hasil isolasi RNA pankreas sapi .....	29
Gambar 4.1.2	Hasil elektroforesis RT-PCR cDNA tripsin kation .....	30
Gambar 4.1.3	Hasil elektroforesis gen tripsin kation setelah proses purifikasi PCR .....	31
Gambar 4.1.5(1)	Hasil transformasi gen tripsin kation dalam <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . .....	32
Gambar 4.1.5(2)	Hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy .....	33
Gambar 4.1.6	Hasil digesti plasmid rekombinan pGEM-T Easy .....	34
Gambar 4.1.7	Hasil purifikasi plasmid rekombinan klon 1 .....	35
Gambar 4.1.9	Konstruksi plasmid rekombinan pGEM-T Easy tripsin kation .....	36

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.5.5(1)	Komposisi RNA <i>mix</i> .....	20
Tabel 3.5.5(2)	Komposisi cDNA <i>synthesis mix</i> .....	20
Tabel 3.5.5(3)	Komposisi PCR <i>mix</i> .....	21
Tabel 3.5.5(4)	Program PCR <i>Touchdown</i> gen tripsin kation .....	22
Tabel 3.5.9(1)	Komposisi <i>A-tailing</i> .....	24
Tabel 3.5.9(2)	Komposisi ligasi gen tripsin kation .....	24
Tabel 3.5.13	Komposisi digesti DNA rekombinan .....	27

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi dari preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian .....	51
Lampiran 2	Komposisi dan cara pembuatan medium LB, SOB, dan SOC .	53
Lampiran 3	Pengukuran efisiensi transformasi .....	55
Lampiran 4	Elektroferogram hasil sekuensing gen tripsin kation pada plasmid pGEM-T Easy dengan primer T7 <i>Forward</i> .....	56
Lampiran 5	Elektroferogram hasil sekuensing gen tripsin kation pada plasmid pGEM-T Easy dengan primer SP6 <i>Reverse</i> .....	59
Lampiran 6	Hasil analisis sekuen gen tripsin kation dengan program BLASTN .....	62
Lampiran 7	Hasil analisis sekuen gen tripsin kation dengan program BLASTX .....	63
Lampiran 8	Hasil <i>alignment</i> sampel sekuen gen tripsin kation dengan sekuen yang terdapat pada <i>database Gene Bank</i> .....	64
Lampiran 9	Hasil translasi sampel sekuen gen tripsin kation ke dalam asam amino menggunakan program Bioedit versi 7.0.9 .....	65

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

Tripsin adalah enzim protease yang dihasilkan oleh sel-sel pankreas yang berfungsi untuk memecah protein menjadi asam amino. Kerja tripsin sangat spesifik yaitu, memotong ikatan peptida pada ujung gugus karboksilat asam amino lisin dan arginin kecuali apabila diikuti oleh prolin pada sisi karboksilnya (Voytek & Gjessing 1970: 513). Tripsin memiliki peranan penting dalam kultur sel mamalia *adherent*, yaitu sebagai bahan pendispersi sel yang menempel (*adhere*) pada permukaan cawan atau botol yang digunakan untuk kultur, baik pada proses pemanenan maupun subkultur (*passage*). Tripsin bekerja dengan cara memotong ikatan peptida sehingga sel terlepas dari permukaan cawan (Phelan 1998: 1.1.1).

Kultur sel mamalia banyak digunakan sebagai teknik dasar untuk memproduksi bahan-bahan biologis di dalam dunia kesehatan, salah satu contohnya adalah vaksin. Beberapa vaksin yang diproduksi menggunakan kultur sel mamalia antara lain adalah vaksin polio, vaksin cacar air, vaksin MMR (*measles, mumps, rubella*) (Lago *dkk.* 2003: 776; Bankamp *dkk.* 2008: 129) dan vaksin influenza (Schwarzer *dkk.* 2009: 4325). Penggunaan kultur sel mamalia yang semakin meluas dalam proses pembuatan vaksin tersebut membuat peran tripsin semakin banyak dibutuhkan (Schwarzer *dkk.* 2009: 4325).

Tripsin yang digunakan pada kultur sel mamalia umumnya diperoleh dari pankreas babi (*porcine*) dan sapi (*bovine*). Enzim tersebut dihasilkan secara alami dalam jumlah yang cukup besar dan dapat dipurifikasi secara langsung (Travis & Roberts 1969: 2884). Tripsin yang paling banyak digunakan adalah tripsin yang berasal dari pankreas babi karena paling ekonomis (Yamaya *dkk.* 2002: 8).

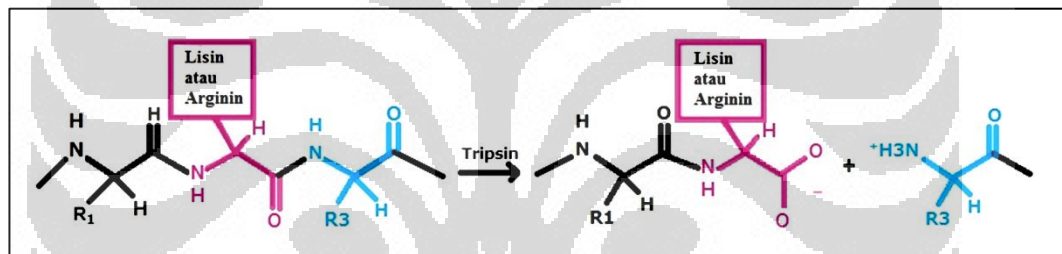
Namun, hal tersebut menjadi masalah di Indonesia, karena mayoritas penduduk Indonesia (87,18 %) adalah muslim (Badan Pusat Statistik 2012: 1).

Permasalahan lainnya adalah cara memperoleh tripsin. Selama ini, tripsin diperoleh dengan cara isolasi dan purifikasi langsung dari pankreas mamalia. Hal tersebut dapat mempermudah penularan penyakit-penyakit dari hewan terinfeksi kepada manusia melalui produk akhir tripsin yang terkontaminasi, contohnya

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Gen tripsin kation

Gen tripsin kation merupakan gen yang mengkode ekspresi enzim tripsin kation pada tubuh individu. Tripsin kation merupakan suatu enzim pemecah protein yang dihasilkan oleh sel-sel pankreas dalam bentuk molekul yang tidak aktif yaitu tripsinogen (Kunitz 1939: 447; Maroux *dkk.* 1971: 5031). Enzim tersebut bekerja secara spesifik dan hanya memotong ikatan peptida protein pada ujung gugus karboksilat (C-terminal) dari asam amino lisin dan arginin kecuali apabila diikuti prolin pada sisi karboksilnya (Gambar 2.1) (Voytek & Gjessing 1970: 513).



Gambar 2.1 Skema pemotongan tripsin  
[Sumber: Berg *dkk.* 2002: 161 diterjemahkan sesuai aslinya.]

Tripsin kation dinamakan berdasarkan muatan yang terkandung dalam enzim tersebut. Tripsin pada umumnya terbagi menjadi dua jenis yaitu, anion dan kation. Kedua jenis tripsin tersebut ditemukan secara bersamaan pada banyak hewan mamalia, salah satunya adalah sapi (*bovine*). Sapi memiliki persentase tripsin anion yang lebih kecil daripada tripsin kation. Tripsin anion ditemukan sebesar 10% pada pankreas sapi (Voytek & Gjessing 1970: 511). Fungsi kedua jenis tripsin tersebut sama yaitu, memotong ikatan peptida protein pada ujung gugus karboksilat asam amino lisin dan arginin. Perbedaan pada kedua jenis tripsin adalah kecepatan hidrolisis substrat. Tripsin kation lebih cepat dalam menghidrolisis substrat daripada tripsin anion (Voytek & Gjessing 1970: 513). Tripsin kation banyak digunakan sebagai enzim hidrolisis pada proses pembuatan

vaksin. Dewasa ini, pembuatan vaksin banyak menggunakan teknik kultur sel mamalia yang membutuhkan tripsin kation sebagai enzim hidrolitik dalam proses pemanenan atau perpindahan sel dari medium lama ke medium baru. Proses tersebut disebut juga sebagai proses *subpassage cell*. Tripsin kation berfungsi untuk mendispersi sel yang melekat pada media pertumbuhan maupun cawan petri tempat kulturnya sehingga mempermudah proses kultur sel baik proses pemanenan sel maupun *subpassage cell* (Phelan 1998: 1.1.1.).

## 2.2 Isolasi RNA

Asam ribonukleat atau RNA adalah asam nukleat berantai tunggal yang tersusun atas monomer-monomer nukleotida dengan gula ribosa. RNA merupakan polimer yang disebut polinukleotida. Setiap polinukleotida tersusun atas monomer-monomer yang disebut nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu basa nitrogen, gula pentosa, dan gugus fosfat. Basa nitrogen pada RNA terdiri dari adenin, guanin, sitosin, dan urasil. Urutan basa-basa nitrogen tersebut dapat mengkode informasi genetik (Campbell *dkk.* 2010: 93).

Beberapa molekul RNA pada sel eukariota berperan penting dalam proses sintesis protein, antara lain, yaitu mRNA, tRNA, rRNA, dan snRNA. mRNA (*mesenger RNA*) berfungsi sebagai pembawa informasi yang menentukan urutan asam amino protein dari DNA ke ribosom. tRNA (*transfer RNA*) memiliki fungsi untuk mentranslasi kodon-kodon mRNA menjadi asam amino. rRNA (*ribosom RNA*) mempunyai peran struktural dan katalitik (ribozim) dalam ribosom. SnRNA (*small nuclear RNA*) mempunyai peran struktural dan katalitik dalam spliosom, yaitu kompleks dari protein dan RNA yang menyambung pra-mRNA dalam nukleus eukariotik (Campbell *dkk.* 2002: 333).

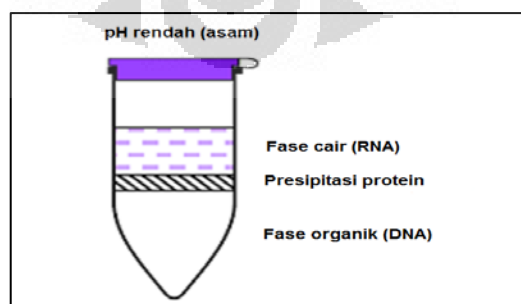
Menurut Sambrook & Russel (2001: 7.2), sel mamalia mengandung RNA sebesar  $10^{-5}$   $\mu$ g, 80--85% dari total RNA adalah rRNA (terutama 28S, 18S, 5,8S, dan 5S) dan sisanya 15--20% terdiri dari berbagai RNA dengan berat molekul yang rendah seperti tRNA dan snRNA. Molekul mRNA hanya ditemukan sebesar 1--5% dari total RNA pada sel mamalia dan memiliki ukuran dan urutan basa nukleotida yang bervariasi. Ukuran panjang mRNA dapat berbeda-beda, mulai



dari beberapa ratus basa sampai beberapa ribu basa nukleotida. Molekul mRNA pada sel mamalia memiliki poli-A yang cukup panjang pada ujung 3'nya sehingga dapat mempermudah mRNA untuk diisolasi. Molekul komplemen poli-T atau primer oligo(dT) dapat digunakan sebagai 'pengait' untuk mengikat poli-A yang terdapat pada ujung mRNA. Dengan begitu, mRNA dapat dipisahkan dengan rRNA dan tRNA yang banyak jumlahnya.

Isolasi adalah prosedur yang digunakan untuk memisahkan suatu bagian dari bagian lain dengan tujuan tertentu (Singleton & Sainsbury 2006: 409). Isolasi RNA digunakan untuk memisahkan RNA dari zat lain sehingga dihasilkan RNA murni. Secara umum terdapat tiga dasar persyaratan isolasi RNA, yaitu melisiskan membran sel untuk mengekspos RNA, pemisahan RNA dari zat-zat dan molekul lainnya seperti DNA, lipid, protein, dan karbohidrat, dan pemulihan RNA dalam bentuk murni (Dale & Schantz 2002: 31--33; Nicholl 2002: 27).

Salah satu metode isolasi RNA adalah metode guanidine tiosianat. Guanidine tiosianat adalah salah satu senyawa yang paling efektif dalam mendenaturasi protein. Prinsip kerja dari metode guanidine tiosianat adalah melisiskan membran sel dan membuat RNA larut di dalam larutan yang mengandung guanidine tiosianat. Penambahan larutan fenol/kloroform pada larutan guanidine tiosianat dapat membuat pH larutan menjadi asam (pH 4). Di bawah kondisi asam, protein dan fragmen DNA (50 pb--10.000 pb) akan berada pada fase organik. Fragmen DNA yang lebih besar dan beberapa protein akan tetap berada pada fase interfase, sedangkan RNA berada pada fase cair (Gambar 2.2.(1)). RNA yang terdapat pada fase cair kemudian dipisahkan untuk dilakukan pencucian dan pemulihan RNA (Ausubel *dkk.* 2003: 4.2.8).



Gambar 2.2 Pemisahan RNA dari molekul protein dan DNA di bawah kondisi asam

[Sumber: Dale & Schantz 2002: 33 diterjemahkan sesuai aslinya.]

## 2.3 Pengklonaan

### 2.3.1 Pengertian pengklonaan gen

Pengklonaan gen adalah suatu proses memasukkan DNA asing atau gen asing ke dalam suatu sel inang dengan bantuan vektor (Wong 1997: 4). Tujuan dari pengklonaan gen adalah memperbanyak gen yang identik. Gen asing yang ingin diperbanyak, disisipkan ke dalam vektor sehingga membentuk suatu DNA rekombinan dan akan mengalami replikasi di dalam sel inang (Griffiths *dkk.* 1999: 300). Klon merupakan kelompok organisme atau koloni bakteri yang mengandung gen target (Campbell *dkk.* 2002: 393). Komponen-komponen penting pada pengklonaan gen adalah sumber DNA, vektor, dan sel inang. Pengklonaan gen memiliki empat tahapan utama, antara lain konstruksi DNA rekombinan, transformasi, seleksi sel klon, dan pengisolasian DNA rekombinan yang membawa gen yang diinginkan (Strachan & Read 1999: 119).

### 2.3.2 Komponen pengklonaan

#### 2.3.2.1 Sumber DNA

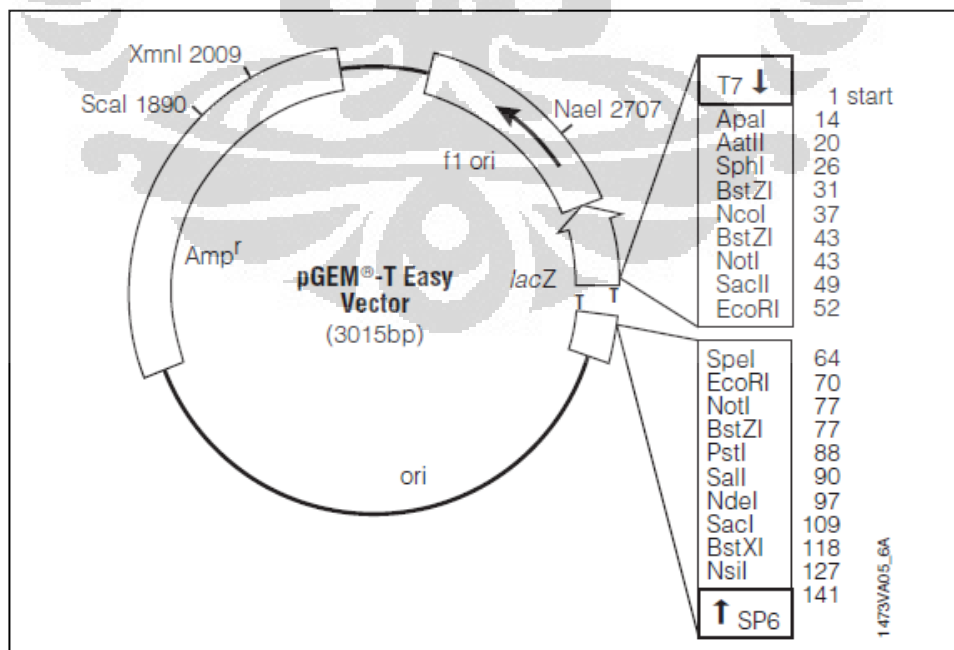
Sumber DNA merupakan salah satu komponen utama dalam pengklonaan gen. Sumber DNA dapat berupa DNA kromosom ataupun *complementary* DNA (cDNA) yang diperoleh dari proses penyalinan mRNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* (Brown 2002: 155; Campbell *dkk.* 2002: 393).

*Complementary* DNA dapat digunakan untuk keperluan ekspresi gen eukariot dalam sel prokariot. *Complementary* DNA diperoleh dari proses penyalinan mRNA yang sudah tidak memiliki daerah intron pada urutan basa nukleotidanya. Daerah intron dapat mencegah ekspresi gen eukariot pada sel prokariot. Sel prokariot tidak memiliki perangkat untuk memotong daerah intron sebagaimana halnya pada eukariot. Oleh karena itu, cDNA banyak dipilih sebagai sumber DNA pada proses pengklonaan maupun ekspresi gen eukariot dalam sel prokariot (Nicholl 2002: 92--94).

### 2.3.2.2 Vektor pGEM-T Easy

Vektor pGEM-T Easy adalah vektor plasmid yang dirancang untuk pengklonaan produk PCR. Vektor pGEM-T Easy merupakan vektor linier yang memiliki basa timin tunggal pada kedua ujung 3'nya yang disebut dengan *T-overhang* (Gambar 2.3.2.2). *T-overhang* pada bagian sisi penyisipan dapat meningkatkan efisiensi ligasi dari produk PCR dengan mencegah resirkularisasi dari vektor dan menyediakan *overhang* yang sesuai untuk produk PCR. Vektor pGEM-T Easy merupakan vektor yang memiliki kemampuan penggandaan gen target yang tinggi (*high-copy number*) yang terdiri dari promotor T7 dan SP6 RNA polimerase (Promega 2010: 1--4).

Vektor pGEM-T Easy memiliki promotor T7 dan SP6 RNA polimerase yang mengapit daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) di dalam  $\alpha$ -peptida yang mengkode enzim  $\beta$ -galaktosidase. Hal tersebut menjadikan hasil klon dapat diseleksi dengan metode penapisan putih biru. Vektor pGEM-T Easy disertai dengan *2x rapid ligation buffer* yang dapat mempercepat proses ligasi. Sistem vektor pGEM T-Easy juga dilengkapi dengan situs ori, *multiple cloning site* (MCS), dan kodon *start*. Vektor tersebut membawa gen  $\beta$ -lactamase (*bla*) yang memberikan resistensi terhadap ampisilin (Promega 2010: 11).



Gambar 2.3.2.2 Vektor pGEM T-Easy  
[Sumber: Promega 2010: 12.]

### 2.3.2.3 Enzim restriksi

Enzim restriksi merupakan enzim yang dapat memotong ikatan fosfodiester pada sekuen nukleotida. Enzim restriksi yang umum digunakan dalam teknologi rekayasa genetika adalah endonuklease tipe II. Hal tersebut disebabkan karena endonuklease tipe II dapat mengenali dan memutus ikatan fosfodiester pada situs pengenalan spesifik dari DNA (Wong 1997: 69). Enzim restriksi dibedakan berdasarkan hasil potongan yang dihasilkan. Beberapa enzim memotong kedua untai DNA pada posisi yang sama dan akan menghasilkan ujung potongan *blunt end*. Contoh enzim tersebut adalah *SmaI*, *HaeIII*, dan *SfoI*. Potongan *blunt end* dihasilkan jika enzim restriksi memotong DNA tepat pada bagian tengah situs pengenalan. Beberapa enzim memotong untai DNA pada posisi yang berbeda dan menghasilkan potongan kohesif yang disebut *sticky end*. Contoh enzim tersebut adalah *EcoRI*, *PstI*, dan *XmaI* (Wong 1997: 70; Primorse *dkk.* 2001: 30). Proses pemotongan fragmen DNA menggunakan enzim restriksi disebut *digesti* (Lewis 2003: 74).

### 2.3.2.4 Enzim ligase

Enzim ligase adalah enzim yang digunakan untuk menggabungkan fragmen-fragmen DNA. Enzim tersebut mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan fosfodiester antara 5'-P dan 3'-OH ujung akhir dua molekul DNA yang berbeda yang saling berdekatan. Enzim ligase digunakan dalam teknik rekayasa genetika karena mampu menyambungkan fragmen DNA baik ujung rata (*blunt end*) maupun ujung kohesif (*sticky end*). Enzim ligase yang biasa digunakan dalam teknik rekayasa genetika biasanya dimurnikan dari bakteri *E. coli* yang telah diinfeksi faga T4. Enzim tersebut dinamakan enzim bakteriofaga T4 DNA ligase (Sambrook & Russell 2001: 1.157-- 1.159).

### 2.3.2.5 Sel inang *E. coli* DH5 $\alpha$

Sel inang dipilih berdasarkan pada tujuan pengklonaan dan sampel DNA yang akan diklonkan (Tamarin 2002: 238). Karakteristik sel inang yang baik dalam pengklonaan antara lain yaitu, memiliki laju pertumbuhan yang cepat, tumbuh dalam jumlah yang banyak, bersifat nonpatogenik, dapat menerima vektor, menjaga stabilitas gen asing, dan dapat mengekspresikan gen asing (Nicholl 2002: 58). Sel inang prokariot yang umum digunakan adalah *E. coli* karena protokol untuk memanfaatkan sel tersebut telah tersedia, relatif lebih mudah, dan informasi genetik kedua sel tersebut telah diketahui (Talaro 2008: 302). *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang dapat tumbuh dengan cepat dalam medium pengayaan, serta memiliki banyak galur yang telah dikarakterisasi (Davis *dkk.* 1994: 47).

*E. coli* DH5 $\alpha$  adalah sel inang yang baik untuk pengklonaan DNA karena memiliki efisiensi transformasi yang tinggi hasil dari mutasi *endA1*, *LacZ $\Delta$ M15, *hsdR17*, dan *RecA1*. Mutasi *endA1* pada *E. coli* DH5 $\alpha$  menyebabkan DNA terjaga dari aktivitas enzim endonuklease I. Mutasi *LacZ $\Delta$ M15 berperan dalam seleksi biru-putih terhadap rekombinan. Mutasi *hsdR17* menjaga efisiensi DNA agar tidak termetilasi, dan mutasi *RecA1* berperan dalam mengurangi terjadinya rekombinasi yang tidak dikehendaki dalam pengklonaan DNA (Karcher 1995: 94).**

## 2.4 *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Teknik *reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)* merupakan metode paling sensitif dalam menyintesis DNA tunggal dari mRNA. Prinsip dasar dari RT-PCR adalah mengubah untai mRNA menjadi DNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* dan primer oligo-dT. Primer oligo-dT akan menempel pada ujung 3' poli-A mRNA dan selanjutnya enzim *reverse transcriptase* akan membentuk untai DNA awal dengan menyintesis basa-basa nukleotida mRNA dengan basa komplementernya. Setelah untai pertama DNA terbentuk, cetakan mRNA didegradasi dengan bantuan enzim RNase H (Kendall

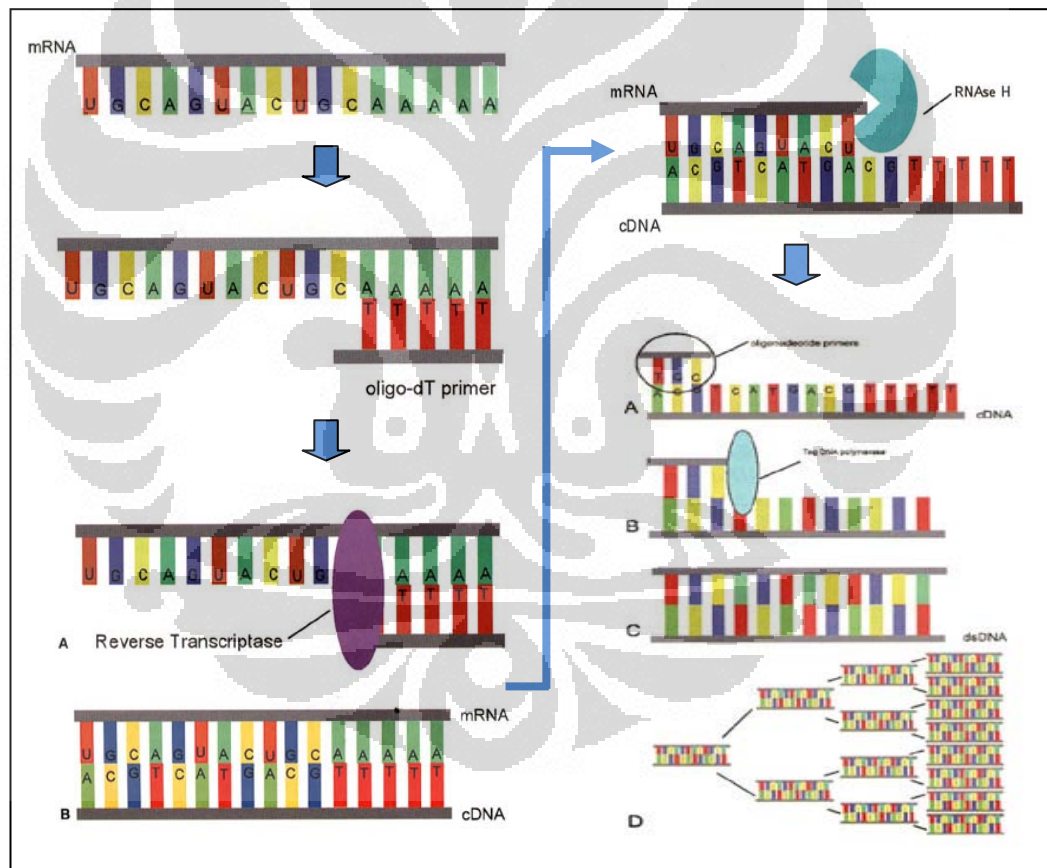
& Riley 2000: 42). Untai pertama DNA merupakan untaian tunggal, sehingga dibutuhkan primer *forward* untuk membuat komplemen untaian tunggal tersebut menjadi DNA untaian ganda. DNA untaian ganda yang telah terbentuk selanjutnya diamplifikasi dengan teknik PCR standar (Gambar 2.4) (Weaver & Hedrick 1997: 81--82).

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik molekuler yang dapat memperbanyak sekuen DNA spesifik menjadi jutaan salinan secara *in vitro*. Teknik PCR menggandakan DNA dengan bantuan enzim *Taq* DNA *polymerase* yang tahan akan suhu tinggi dan sepasang primer oligonukleotida yang masing-masing komplementer dengan ujung 3' dari salah satu untaian DNA sasaran (Passarge 2007: 60). Prinsip kerja PCR adalah reaksi enzimatik dari proses polimerisasi DNA untuk memperbanyak bagian-bagian spesifik DNA yang diinisiasi dengan pelekatan primer. Primer tersebut akan mengikat daerah spesifik pada DNA yang akan diperbanyak dan menginisiasi replikasi DNA sehingga menghasilkan salinan DNA yang sama. Primer yang digunakan pada proses PCR adalah primer *forward* dan *reverse* (Fairbanks & Andersen 1999: 277; Russell 1994: 401-402).

Komponen-komponen yang digunakan pada proses PCR antara lain adalah DNA *template* yang mengandung sekuen spesifik yang akan diperbanyak, dNTP (deoksiribonukleotida trifosfat) berperan sebagai sumber monomer nukleotida dalam polimerisasi DNA, PCR *buffer* berperan dalam mempertahankan kestabilan pH, primer *forward* dan *reverse*, kation divalen berperan sebagai kofaktor enzim DNA polimerase. Komponen lain yang digunakan di dalam PCR adalah *Taq* DNA *polymerase* yang berperan dalam menghasilkan produk DNA target, dan akuabides berperan sebagai pelarut (Paolella 1998: 182). Siklus PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing* (pelekatan) dan polimerisasi (pemanjangan primer sehingga membentuk rantai DNA yang diinginkan (Klug & Cummings 1994: 291 & 403).

Tahap awal dalam reaksi PCR adalah denaturasi, yaitu proses pemisahan DNA untaian ganda menjadi untaian tunggal. Suhu proses denaturasi tergantung pada banyaknya basa guanin dan sitosin, serta panjang cetakan DNA. Semakin panjang cetakan DNA dan semakin banyak basa guanin dan sitosin yang

dikandung, maka semakin tinggi suhu yang diperlukan, serta semakin lama waktu yang dibutuhkan. Suhu umum yang digunakan untuk denaturasi adalah sekitar 90--96° C. Tahap kedua dalam reaksi PCR adalah *annealing* yang merupakan proses pelekatan primer pada cetakan DNA. Suhu *annealing* biasanya berada antara 3°--5° C lebih rendah daripada *melting temperature* terendah primer. Suhu *annealing* yang digunakan adalah antara 50°--70° C. Tahap ketiga adalah polimerisasi, yaitu proses pemanjangan primer oligonukleotida dengan bantuan enzim Taq DNA polymerase. Suhu pada tahap polimerisasi harus disesuaikan dengan suhu optimum kerja enzim yang digunakan. Enzim *Taq DNA polymerase* umumnya menggunakan suhu polimerisasi antara 72°--78° C (Sambrook & Russell 2001: 8.8--8.9).



Gambar 2.4 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)  
[Sumber: Kendall & Rilley 2000: 42.]

## 2.5 Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik. Prinsip kerja elektroforesis ditujukan terhadap pemisahan molekul-molekul organik seperti DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukuran ataupun muatan. Tujuan pemisahan molekul-molekul tersebut adalah untuk mengetahui ukuran atau jumlah basa serta mengetahui ukuran basa nukleotida (Fairbanks & Andersen 1999: 278).

Teknik elektroforesis menggunakan matriks gel yang berfungsi sebagai medan listrik tempat terjadinya migrasi dari molekul-molekul organik. Molekul bermuatan negatif (anion) akan bermigrasi ke elektroda positif (anoda), sedangkan molekul bermuatan positif (kation) akan bermigrasi ke elektroda negatif (katoda). Elektroforesis merupakan salah satu cara yang digunakan untuk memvisualisasikan hasil PCR berupa fragmen-fragmen DNA yang telah diamplifikasi (Freifelder 1987: 71). Visualisasi fragmen DNA atau RNA dapat dilihat dengan pewarnaan menggunakan etidium bromida (EtBr) sebagai agen interkalase yang dapat meningkatkan daya fluoresensi DNA di bawah sinar ultraviolet (UV) (Martin 1996: 50).

## 2.6 Transformasi DNA rekombinan pada sel inang

Transformasi adalah salah satu cara untuk memasukkan fragmen DNA sisipan ke dalam sel bakteri (Campbell *dkk.* 2002: 354). Terdapat beberapa metode transformasi. Pemilihan metode yang digunakan untuk transformasi tergantung pada sel inang yang digunakan. Transformasi pada sel inang bakteri dapat dilakukan dengan teknik kejutan panas (*heat shock*) dan elektroporasi. Teknik kejutan panas dilakukan dengan mensuspensikan sel bakteri ke dalam larutan yang memiliki kation bivalen seperti  $\text{CaCl}_2$ . Perlakuan  $\text{CaCl}_2$  menyebabkan membran sel menjadi lebih permeabel dan bermuatan positif, sehingga menarik DNA yang bermuatan negatif masuk ke dalam sel (Seidman *dkk.* 1997: 1.8.1--1.8.10; Primorse *dkk.* 2001: 18). Sel bakteri yang sudah kompeten dapat ditransformasi dengan DNA rekombinan dengan cara diberikan



kejutan panas pada suhu sekitar 37°--42° C. Metode kejutan panas dapat menghasilkan efisiensi transformasi yang tinggi dengan kisaran  $5 \times 10^5$ -- $2 \times 10^7$  cfu/ $\mu$ g (Sambrook & Russell 2001: 1.25 & 1.116).

## **2.7 Screening**

*Screening* adalah tahapan untuk menyeleksi klon pembawa gen target. Salah satu cara untuk menyeleksi klon pembawa gen target adalah dengan seleksi koloni putih biru. Seleksi putih biru atau  $\alpha$ -komplementasi adalah metode *screening* yang melibatkan gen *lacZ*. Gen *lacZ* merupakan gen yang memproduksi enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dapat menghidrolisis X-gal dan menghasilkan pigmen biru (Raven & Johnson 2002: 396--397). Vektor yang tidak mengandung fragmen gen target akan menghasilkan koloni berwarna biru karena gen *lacZ* yang terdapat didalam plasmid tetap berfungsi sehingga dapat menghidrolisis X-gal. Sebaliknya, vektor yang mengandung fragmen gen target akan menghasilkan koloni berwarna putih akibat rusaknya gen *lacZ*, sehingga tidak dapat memproduksi enzim  $\beta$ -galaktosidase dan pada akhirnya X-gal tidak terhidrolisis (Raven & Johnson 2002: 396--397). Kemampuan bakteri untuk menghasilkan  $\beta$ -Galaktosidase yang akan menghidrolisis X-gal disebut  $\alpha$ -komplementasi (Davis *dkk.* 1994: 239--240).

## **2.8 Sekuensing DNA dan analisis hasil sekuensing**

Sekuensing DNA adalah proses pengenalan urutan basa nukleotida pada suatu fragmen DNA (Nicholl 2002: 36). Sekuensing DNA digunakan dalam berbagai aplikasi, antara lain di bidang rekayasa genetika sebagai konfirmasi identitas suatu klon, karakterisasi cDNA, verifikasi DNA rekombinan, dan identifikasi polimorfisme (mutasi pada gen tertentu). Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert merupakan metode sekuensing yang menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai fragmen DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer

dari fragmen DNA target (Sambrook & Russell 2001: 3.11 & 13.7). Sebagian besar proses sekuensing telah dimodifikasi menjadi suatu program pada komputer, sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Proses tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger. Komputerisasi program DNA sekuensing dapat menggunakan beberapa metode yaitu, metode Maxam-Gilbert, metode Sanger, dan metode *automated DNA sequencing* (Nicholl 2002: 129).

Hasil sekuensing dapat dianalisis dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dikembangkan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Program BLAST bertujuan untuk menelusuri identitas sekuen dari suatu sampel dengan cara membandingkan data sekuen sampel dengan data sekuen yang terdapat pada *Gene Bank*. Program BLAST menggunakan prinsip algoritma yang digunakan untuk membandingkan data sekuen biologis (sekuen asam amino dan nukleotida) secara cepat. Program BLAST dapat diakses secara *online* pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). BLAST memiliki variasi program untuk analisis homologi sekuen seperti BLASTN, BLASTP, dan BLASTX. Program BLASTN digunakan untuk mencari tingkat kesamaan sekuen basa nukleotida sampel dengan sekuen basa nukleotida yang terdapat pada *Gene Bank*. Program BLASTP digunakan untuk mencari tingkat kesamaan sekuen asam amino sampel dengan *database* protein. Program BLASTX digunakan untuk mencari tingkat kesamaan sekuen basa nukleotida sampel dengan *database* protein (Cherry 1995: 7.7.12--7.7.13; Ausubel *dkk.* 2003: 19.3.1--19.3.29). Program lain yang dapat digunakan untuk analisis hasil sekuensing adalah program Bioedit versi 7.0.9. Bioedit adalah program *editor* sekuen biologis yang dapat digunakan pada Windows 95/98/NT/2000/XP yang bertujuan untuk mengedit, meng-*alignment*, memanipulasi, dan menganalisis sekuen protein dan basa nukleotida (Hall 2001: 5).

## **BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular, Laboratorium Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong. Penelitian dilakukan selama 8 bulan, terhitung sejak Oktober 2011 hingga Mei 2012.

### **3.2 Bahan**

#### **3.2.1 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah potongan pankreas sapi yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan Bubulak, Bogor, Jawa Barat.

#### **3.2.2 Vektor**

Vektor yang digunakan sebagai pembawa DNA sisipan ke dalam sel inang adalah pGEM T-Easy (3.015 pb) [Promega].

#### **3.2.3 Kultur sel inang**

Kultur sel inang yang digunakan adalah *E. coli strain* DH5 $\alpha$  yang ditumbuhkan pada medium Luria Bertani (LB) agar.

#### **3.2.4 Bahan Kimia**

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian antara lain yaitu, *yeast extract* [Scharlau], Tripton [Merck], natrium klorida (NaCl) [Merck], kalium

klorida (KCl) [Merck], dNTP mix [Promega], agarosa [1<sup>st</sup> Base], KAPA taq polimerase [Biosystems], *GeneJet RNA purification kit* [Fermentas], *first strand cDNA synthesis* [Fermentas], *SuperScript™ II reverse transcriptase* [Invitrogen], *gel/PCR purification kit* [GeneAid], *buffer 2x Rapid Ligation* [Promega], T4 DNA ligase [Promega], T4 DNA ligase *buffer* [Promega], ampicilin [Merck], IPTG [Invitrogen], X-Gal [Invitrogen], dimetil sulfoksida (DMSO) [Sigma-Aldrich], *loading dye 6x* [Fermentas], *DNA ladder* [Fermentas], enzim restriksi *SfoI* [NEB], enzim restriksi *XmaI* [NEB], *bufferNEB 4* [NEB], Rnase A [Fermentas], etanol 70%, etanol 96%, ddH<sub>2</sub>O steril, nitrogen cair, proteinase K, enzim HF Phusion [NEB], Polietilenglikol (PEG), diethylpurocarbonate (DEPC) [Merck], β-mercaptoetanol, MOPS [Sigma], sodium asetat, etidium bromida (EtBr) [Sigma], EDTA, dan sepasang primer spesifik untuk gen tripsin kation yaitu *cat-tryp-forward* (5'- AATTCGGCGCCATGAAGACCTTCATCTTTCTG-3') [1st Base] serta *cat-tryp-reverse* (5'TTGCCCGGGTTAGTGATGGTGATGGT GATGGTTGGAGGCGATGGTTGC-3') [1st Base].

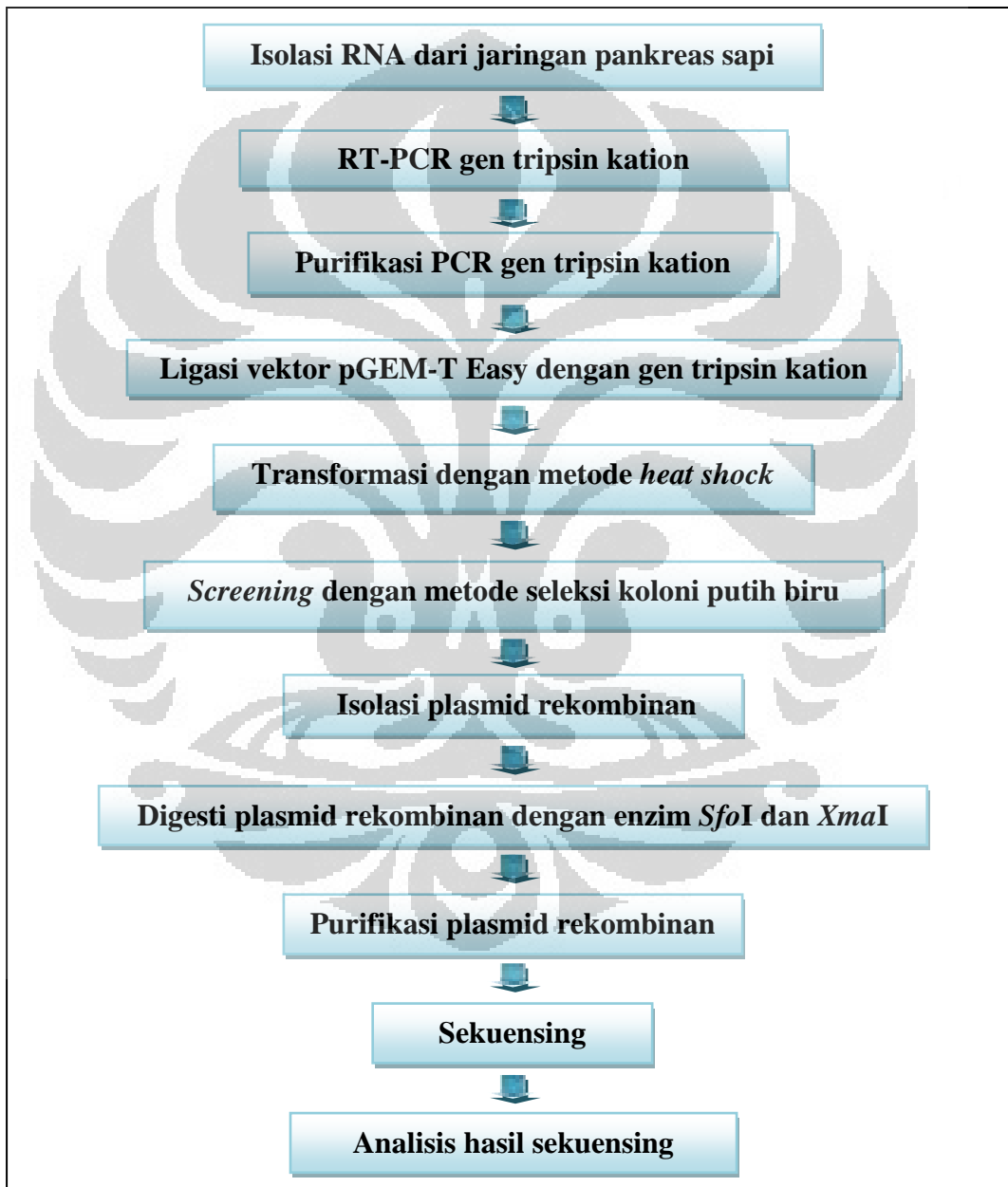
### 3.3 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah *thermal cycler* [Eppendorf Master Cycler Personal], Elektroforesis [Mupid], *laminar flow cabinet* [ESCO], spektrofotometer UV-VIS [Hitachi U-2001], *shaker incubator* [Koehner], *centrifuge* [Sorval Fresco], vorteks [Supermixer K], autoklaf [Iwaki], milipore [Simpak 1], pH meter, kamera digital [Kodak], neraca analitik [RAD WAG WAS 220/C/2], *thermomixer* [Eppendorf Thermomixer Comfort], tabung nitrogen cair [XT 10 Taylor-Wharton], konsentrator [Eppendorf Consentator 5301], *microwave* [Sharp], inkubator [Memmert], *hot plate with magnetic stirrer* [Cimarec-2], pipet mikro berukuran 0,1--2,5 µl, 0,1--10 µl, 10--100 µl, 100--1000 µl [Gibson], *nanodrop spectrophotometer* [ND-1000], tabung mikrosentrifugasi & tabung PCR [Sorenson], tips mikropipet [Sorenson], tabung falkon [Corning], Lemari pendingin [Sharp], *Freezer -74°*, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur 25ml [Iwaki pyrex], erlenmeyer 250 ml [Iwaki pyrex], parafilm [Sigma], lemari asam [Esco], Sarung tangan [Sensi gloves], *plastic seal* [Klin Pak], perangkat

dokumentasi gel [kodak], mikroskop, *beaker glass* 100 ml dan 200 ml [Iwaki pyrex], laptop [Benq], mortar, korek api, ose, pinset, *triangle spreader*, dan spidol permanen [Faber castle].

### 3.4 Skema kerja penelitian

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Skema kerja penelitian

### 3.5 Cara kerja

#### 3.5.1 Pembuatan larutan/*buffer*

Pembuatan larutan/*buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 3.5.2 Pembuatan medium

Pembuatan medium dapat dilihat pada Lampiran 2.

#### 3.5.3 Isolasi RNA pankreas sapi

Molekul RNA total pankreas sapi diisolasi dengan menggunakan *Gene Jet RNA purification kit* (Fermentas 2011: 6--7). Proses isolasi RNA total diawali dengan menggerus pankreas sapi dengan nitrogen cair di dalam mortar, kemudian sebanyak 30 mg sampel dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril. Sampel kemudian dicampur dengan 300  $\mu$ l *lysis buffer* yang mengandung  $\beta$ -mercaptoetanol. Campuran selanjutnya dihomogenisasi dengan vorteks selama 10 detik dan ditambahkan larutan Proteinase K yang telah diencerkan di dalam *TE buffer* sebelumnya (10 $\mu$ l proteinase K dalam 590  $\mu$ l *TE buffer*) sebanyak 600  $\mu$ l, kemudian campuran divorteks. Campuran diinkubasi pada suhu 15--25° C selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril dan dicampur dengan 450  $\mu$ l etanol 96%.

Campuran supernatan-etanol 96% dimasukkan maksimal sebanyak 700  $\mu$ l ke dalam kolom purifikasi RNA yang telah dimasukkan ke dalam tabung koleksi. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terdapat di dalam tabung koleksi dibuang. Sentrifugasi dilakukan kembali apabila campuran supernatan-etanol 96% lebih dari 700  $\mu$ l. Sebanyak 700  $\mu$ l *wash buffer 1* ditambahkan ke dalam kolom purifikasi RNA dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terdapat di dalam tabung koleksi dibuang. Kolom purifikasi RNA kemudian ditambahkan larutan *wash buffer 2*

sebanyak 600  $\mu$ l dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terdapat di dalam tabung koleksi dibuang.

Larutan *wash buffer 2* sebanyak 250  $\mu$ l ditambahkan ke dalam kolom purifikasi RNA. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 2 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan di dalam tabung koleksi dibuang. Kolom purifikasi RNA dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril, kemudian *nuclease-free water* sebanyak 100  $\mu$ l ditambahkan ke tengah membran kolom purifikasi RNA. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang tertampung pada tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril adalah sampel RNA murni. Sampel kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -74° C.

#### 3.5.4 Pemisahan fragmen RNA dengan elektroforesis gel agarosa

Fragmen RNA dipisahkan dengan metode elektroforesis gel agarosa berdasarkan modifikasi dari Sambrook & Russell (2001: 7.21--7.34). Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 1% dalam *buffer* TAE 1x dengan campuran formaldehid 2,2 M. Sampel RNA sebanyak 3  $\mu$ l ditambahkan ke dalam *loading buffer* yang terdiri dari 1  $\mu$ l *buffer* MOPS 10x dan 2  $\mu$ l formaldehid 30 M, kemudian campuran dihomogenisasi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 85° C. Sampel selanjutnya didinginkan di dalam es selama 10 menit dan ditambahkan *loading dye* 6x, serta dihomogenisasi dengan mikropipet. Campuran dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Gel agarosa direndam di dalam *running buffer* MOPS 1x. Menurut Sambrook & Russell (2001: 7.34), sampel yang terdapat didalam sumur gel agarosa yang direndam dalam *buffer* MOPS 1x membutuhkan tegangan 4--5 V/cm untuk migrasi saat elektroforesis berlangsung. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 25 V selama 95 menit. Gel agarosa dimasukkan ke dalam wadah berisi etidium bromida (EtBr) selama 15 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat di bawah sinar UV dan difoto menggunakan kamera digital.

### 3.5.5 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Pembuatan cDNA dari mRNA pankreas sapi dilakukan berdasarkan metode *reverse transcription* PCR (RT-PCR) menggunakan modifikasi dari dua kit yaitu *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* [Invitrogen] dan *First Strand cDNA Synthesis* [Fermentas]. Hal tersebut disebabkan karena primer Oligo(dT) yang digunakan merupakan produk dari Fermentas, sedangkan enzim *reverse transcriptase* merupakan produk dari Invitrogen. Terdapat dua tahapan utama dalam metode tersebut yaitu sintesis cDNA kemudian amplifikasi gen dengan teknik standar PCR (Fermentas 2011: 1--11; Invitrogen 2007: 1--4). Proses sintesis untai pertama cDNA dimulai dengan pembuatan RNA *mix*, dengan komposisi masing-masing pada Tabel 3.5.5(1).

Tabel 3.5.5(1) Komposisi RNA *mix*.

<b>Bahan</b>	<b>Volume</b>
Oligo(dT)	5 $\mu$ l
Sampel RNA	50 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>55 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: Fermentas 2011: 7.]

RNA *mix* diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65° C, kemudian segera didinginkan di dalam es selama 2--3 menit. Persiapan cDNA *synthesis mix* sesuai dengan komposisi pada Tabel 3.5.5(2).

Tabel 3.5.5(2) Komposisi cDNA *synthesis mix*.

<b>Bahan</b>	<b>Volume</b>
dNTP 10 mM	10 $\mu$ l
<i>Buffer first-strand</i> 5x	20 $\mu$ l
DTT 0,1 M	10 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: Invitrogen 2007: 2.]



Penyampuran 50  $\mu$ l cDNA *synthesis mix* ke dalam 55  $\mu$ l RNA *mix* dilakukan secara perlahan. Campuran tersebut di inkubasi selama 2 menit pada suhu 42° C, kemudian ditambahkan enzim *SuperScript™ II reverse transcriptase* sebanyak 5  $\mu$ l. Campuran kemudian dihomogenisasi dengan pipet secara perlahan dan diinkubasi pada suhu 42° C selama 50 menit. Inkubasi dilanjutkan pada suhu 70° C selama 15 menit. Sampel cDNA yang telah terbentuk dapat disimpan pada suhu -20° C atau dapat langsung digunakan untuk proses PCR selanjutnya.

Tahapan untuk amplifikasi fragmen gen tripsin kation menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Persiapan pertama dalam tahapan tersebut adalah PCR *mix* dengan komposisi seperti pada Tabel 3.5.5(3).

Tabel 3.5.5(3) Komposisi PCR *mix*

Bahan	Sampel	Kontrol (-)
ddH <sub>2</sub> O	16,1 $\mu$ l	16,6 $\mu$ l
<i>Buffer HF Phusion 5x</i>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
<i>Cat-tryp-for</i>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<i>Cat-tryp-rev</i>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
dNTP	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
DMSO	0,75 $\mu$ l	0,75 $\mu$ l
<i>Template cDNA</i>	0,5 $\mu$ l	-
Enzim <i>HF Phusion Taq DNA polymerase</i>	0,15 $\mu$ l	0,15 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: Finnzymes 2007: 1.]

Proses PCR tersebut menggunakan primer yang telah dikonstruksi sebelumnya, yaitu primer *cat-tryp-forward* (5' - AATTTCGGCGCCATGAAGACCTTCATC TTTCTG-3') [1st Base] dan primer *cat-tryp-reverse* (5'TTGCCCGGGTTAGTG ATGGTGATGGTGATGGTTGGAGGCGATGGTTGC-3') [1st Base]. Kedua primer tersebut mengamplifikasi gen tripsin kation sebesar 780 pb pada sampel cDNA. Selain mengandung sekuen spesifik untuk amplifikasi gen kation, primer *forward* juga ditambahkan situs pemotongan untuk enzim restriksi *SfoI*, sementara pada primer *reverse* ditambahkan situs pemotongan enzim restriksi *XmaI*, *His-tag*

dan *stop codon*. Penambahan situs pemotongan dilakukan agar gen terisolasi dapat disubkloning ke dalam vektor ekspresi lain. *His-tag* ditambahkan untuk mempermudah proses isolasi protein rekombinan menggunakan kolom Ni-NTA.

Tahapan berikutnya, dilakukan pengaturan tertentu pada mesin PCR. Program yang digunakan untuk mengamplifikasi gen tripsin kation adalah program *Touchdown*. Program *Touchdown* adalah program PCR yang memiliki prinsip kerja yaitu penurunan suhu *annealing* setiap satu siklus PCR. Suhu *annealing* turun 0,5°--4° C setiap satu siklus. Suhu *annealing* pada siklus pertama menggunakan *temperature melting* tertinggi dari primer yang digunakan, kemudian siklus-siklus berikutnya terjadi penurunan suhu *annealing*. Siklus terakhir berhenti setelah proses PCR mencakup *temperature melting* primer terendah sebagai suhu *annealing* (Ausubel *dkk.* 2003: 14.8.5). Program *Touchdown* untuk mengamplifikasi gen tripsin kation dapat dilihat pada Tabel 3.5.5(4). Hasil RT PCR tersebut kemudian dapat dilihat dengan elektroforesis.

Tabel 3.5.5(4) Program PCR *Touchdown* gen tripsin kation

No	Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
1	Pradenaturasi	98° C	30 detik	-
2	Denaturasi	98° C	10 detik	
3	<i>Annealing</i>	78,1° C (-0,5° C ± 00)	15 detik	
4	Elongasi	72° C	30 detik	
5	GO TO 2	-	-	19x
6	Denaturasi	98° C	10 detik	
7	<i>Annealing</i>	68,4 ° C	15 detik	
8	Elongasi	72° C	30 detik	
9	GO TO 6	-	-	9x
10	Elongasi akhir	72° C	10 menit	-
	Preservasi	4° C	∞	-

### 3.5.6 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan media gel agarosa. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 1% dalam *buffer* TAE 1x. Sampel DNA ditambahkan dengan *loading dye* 6x. Campuran kemudian dihomogenisasi menggunakan mikropipet dan campuran dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Marka 1kb DNA *ladders* dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa lainnya sebagai pembanding ukuran fragmen DNA. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 V selama 25--30 menit. Gel agarosa kemudian direndam di dalam larutan etidium bromida (EtBr) selama 10 menit. Pita-pita DNA yang terbentuk pada gel dapat dilihat di bawah sinar UV dan didokumentasikan untuk dianalisis.

### 3.5.7 Purifikasi produk PCR

Proses purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan kit "*Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*" dari Geneaid (2010: 3). Sampel sebanyak 100  $\mu$ l ditambahkan larutan DF *buffers* dengan perbandingan volume 1:5. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam kolom DF yang telah dimasukkan ke dalam tabung koleksi 2 ml. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang tertampung pada tabung koleksi dibuang. Sebanyak 600  $\mu$ l *Wash buffer* ditambahkan ke dalam kolom DF kemudian didiamkan selama 1 menit. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 30 detik, supernatan yang berada dalam tabung koleksi dibuang. Tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Tujuan sentrifugasi tersebut adalah untuk proses pengeringan. Kolom DF yang sudah kering dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril, kemudian ditambahkan 35--50  $\mu$ l *elution buffer* dan didiamkan selama 2 menit. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang tertampung pada tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril merupakan sampel DNA hasil ekstraksi DNA dari fragmen gel agarosa dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu  $-20^{\circ}$  C.

### 3.5.8 Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan mesin *Nano Drop Spectrophotometer* [ND-1000].

### 3.5.9 *A-tailing* dan ligasi

Ligasi dilakukan dengan menggunakan plasmid pGEM-T *Easy* berdasarkan prosedur panduan ligasi Promega (2010: 1--27). Sampel DNA ditambahkan ujung poli-A atau *A-tailing* sebelum dilakukan proses ligasi, dengan tujuan untuk mempermudah proses ligasi pada plasmid pGEM-T *Easy*. Komposisi campuran dalam proses *A-tailing* dapat dilihat pada Tabel 3.5.9(1).

Tabel 3.5.9(1) Komposisi *A-tailing*

Bahan	Volume
Gen tripsin kation	10 $\mu$ l
dNTP <i>mix</i>	0,1 $\mu$ l
<i>Buffer Taq DNA polymerase</i>	1 $\mu$ l
Enzim <i>Taq DNA polymerase</i>	0,1 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>11,2 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: Promega 2010: 14.]

Sampel DNA yang telah ditambahkan ujung poli-A kemudian diligasikan dengan plasmid pGEM-T *Easy*. Campuran dalam proses ligasi dapat dilihat pada Tabel 3.5.9(2). Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 4° C selama 12--18 jam.

Tabel 3.5.9(2) Komposisi ligasi gen tripsin kation

Bahan	Volume
<i>2x ligation buffer</i>	5 $\mu$ l
Sampel DNA	3 $\mu$ l
Plasmid pGEM T-Easy	1 $\mu$ l
T4 DNA ligase	1 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: Promega 2010: 4.]

### 3.5.10 Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$

Pembuatan sel kompeten dilakukan berdasarkan metode Inoue (Sambrook & Russell 2001: 1.112--1.115). Bakteri yang digunakan adalah *E. coli strain* DH5 $\alpha$ . Sebanyak 1 ose koloni dari cawan petri biakan diinokulasi ke dalam 50 ml medium SOB cair, kemudian diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu 30° C dengan kecepatan 150 rpm sampai nilai OD<sub>600</sub> sebesar 0,4-0,8. Kultur bakteri diinkubasi di dalam es setelah nilai OD<sub>600</sub> mencapai angka 0,4-0,8, kemudian kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang secara aseptis dan pelet disuspensi dengan TB *buffer* dingin sebanyak 16,75 ml.

Suspensi diinkubasi di dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang secara aseptis dan pelet disuspensi kembali dengan ditambah 4 ml TB *buffer* dingin kemudian diinkubasi di es selama 10 menit. Dimetil Sulfoxida (DMSO) sebanyak 0,3 ml ditambahkan ke dalam suspensi dan diinkubasi di dalam es selama 10 menit. Sebanyak 200  $\mu$ l suspensi dipindahkan ke dalam beberapa tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril dan disimpan di dalam tabung nitrogen cair.

### 3.5.11 Transformasi DNA rekombinan pada sel inang

Proses transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* (Sambrook & Russell 2001 : 1.105--1.109). Sel kompeten dicampur dengan hasil ligasi dengan perbandingan 20:1. Campuran diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Campuran kemudian diinkubasi di dalam *thermomixer* dengan suhu 42° C selama 1 menit, kemudian diinkubasi di dalam es selama 2 menit. Campuran kemudian ditambahkan medium SOC cair sebanyak 800  $\mu$ l dan diinkubasi di dalam inkubator *shaker* pada suhu 37° C dengan kecepatan 150 rpm selama satu jam. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Supernatan sebanyak 800  $\mu$ l dibuang dan 200  $\mu$ l sisa supernatan yang terbentuk digunakan untuk mensuspensikan pelet. Hasil suspensi disebar merata ke dalam medium LB

agar yang mengandung antibiotik ampicilin 100 µg/ml, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosidase (IPTG) 0,1 M, dan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosidase (X-GAL). Medium seleksi kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 12--18 jam.

### 3.5.12 Isolasi plasmid rekombinan

Isolasi plasmid dari hasil transformasi dilakukan berdasarkan metode *Alkaline Lysis SDS Minipreparation* (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34). Koloni bakteri hasil pengklonaan yang positif (berwarna putih) ditumbuhkan pada medium LB cair yang mengandung ampicilin 100 µg/ml dan diinkubasi di dalam inkubator *shaker* pada suhu 37° C dengan kecepatan 150 rpm selama 12--18 jam. Medium yang mengandung koloni bakteri yang telah tumbuh kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet dicampurkan dengan *Alkaline lysis solution I* dingin sebanyak 100 µl. Campuran kemudian dihomogenisasi dengan vorteks dan diinkubasi di dalam suhu ruang selama 5 menit. *Alkaline lysis solution II* sebanyak 200 µl kemudian ditambahkan pada suspensi pelet dan dihomogenisasi dengan cara membolak-balikkan tabung dengan perlahan ke atas dan ke bawah beberapa kali. Campuran kemudian diinkubasi di dalam es selama 5 menit. *Alkaline lysis solution III* dingin sebanyak 150 µl ditambahkan dengan segera dan dihomogenisasi dengan cara mengguncang tabung dengan kuat ke atas dan ke bawah beberapa kali. Campuran kemudian diinkubasi di es selama 5 menit.

Sentrifugasi dilakukan pada campuran yang telah diinkubasi di dalam es dengan kecepatan 13000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril yang baru, kemudian ditambahkan larutan isopropanol sebanyak 300 µl. Campuran dihomogenisasi dengan cara membolak-balikkan tabung dan diinkubasi di dalam suhu ruang selama 30 menit. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 30 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang kemudian pelet ditambahkan dengan larutan etanol 70%

dingin sebanyak 500  $\mu$ l. Sentrifugasi selanjutnya dilakukan dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C dan supernatan yang dihasilkan dibuang. Pelet dikeringkan dan dilarutkan di dalam 50  $\mu$ l Tris-HCl 10 mM pH 8 + RNase 1 mg/ml.

### 3.5.13 Verifikasi DNA rekombinan dengan digesti

Proses digesti DNA dilakukan dengan menggunakan dua enzim restriksi yaitu *Sfo*I dan *Xma*I [NEB]. Reaksi digesti DNA rekombinan dibuat dengan mencampur seluruh komponen reaksi (*buffer*, enzim, DNA *template*, dan ddH<sub>2</sub>O) pada tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril. Komposisi reaksi digesti DNA rekombinan dapat dilihat pada Tabel 3.5.13. Campuran reaksi digesti kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam. Hasil digesti divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Tabel 3.5.13 Komposisi digesti DNA rekombinan

Bahan	Volume
ddH <sub>2</sub> O	6,8 $\mu$ l
<i>Buffer</i> NEB 4	1,0 $\mu$ l
<i>Sfo</i> I	0,1 $\mu$ l
<i>Xma</i> I	0,1 $\mu$ l
Plasmid rekombinan	2,0 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>10,0 <math>\mu</math>l</b>

[Sumber: NEB 2012: 1.]

### 3.5.14 Purifikasi plasmid rekombinan

Plasmid yang telah diisolasi dipurifikasi untuk keperluan sekuensing. Proses purifikasi plasmid dilakukan berdasarkan metode Treisman (Sambrook & Russell 2001: 1.59--1.61). Proses purifikasi diawali dengan menambahkan larutan PEG/2,5M NaCl<sub>2</sub> 20% sebanyak 30  $\mu$ l. Campuran kemudian dihomogenisasi dengan cara membolak-balik tabung dan diinkubasi di dalam es

selama 1 jam. Campuran selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Campuran kemudian ditambahkan larutan etanol 70% dingin sebanyak 100 µl dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet di keringkan. Setelah kering, pelet dilarutkan dalam 20 µl Tris-HCl 10 mM dengan pH 8.

### 3.5.15 Sekuensing dan analisis hasil sekuensing

Sampel yang digunakan untuk sekuensing adalah plasmid rekombinan pGEM-T Easy Tripsin Kation klon positif yang sudah dipurifikasi dengan PEG/2,5M NaCl<sub>2</sub> 20%. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan jasa Laboratorium 1<sup>st</sup> Base di Singapura. Proses sekuensing plasmid rekombinan menggunakan primer T7 *forward* dan SP6 *reverse*. Hasil sekuensing yang akan diperoleh berupa elektroferogram dan data urutan nukleotida, masing-masing untuk hasil sekuen *forward* dan *reverse*. Grafik elektroferogram dan data urutan nukleotida dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak Bioedit versi 7.0.9. Elektroferogram dan urutan nukleotida dibuka dengan program Bioedit kemudian dicari sekuen primer *forward* dan *reverse* gen tripsin kation. Urutan nukleotida sampel selanjutnya dianalisis dengan program bioinformatik BLASTN dan BLASTX pada situs *online* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Urutan asam amino pada sampel dapat diketahui dengan program Bioedit versi 7.0.9. Situs enzim restriksi dapat diketahui dengan program pDRAW 32, sedangkan konstruksi plasmid dapat dibuat dengan menggunakan program PLASDRAW.

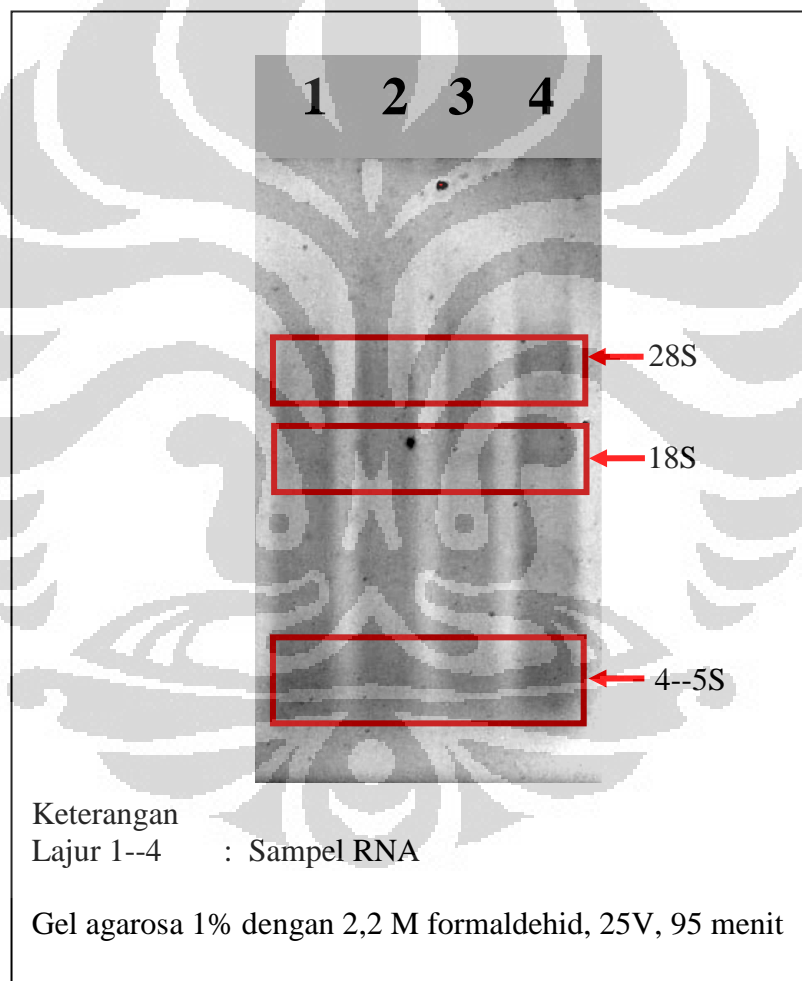


## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

#### 4.1.1 Isolasi RNA pankreas sapi

Hasil isolasi RNA pankreas sapi yang divisualisasi dengan gel agarosa 1% yang mengandung formaldehid 2,2 M dapat dilihat pada Gambar 4.1.1.

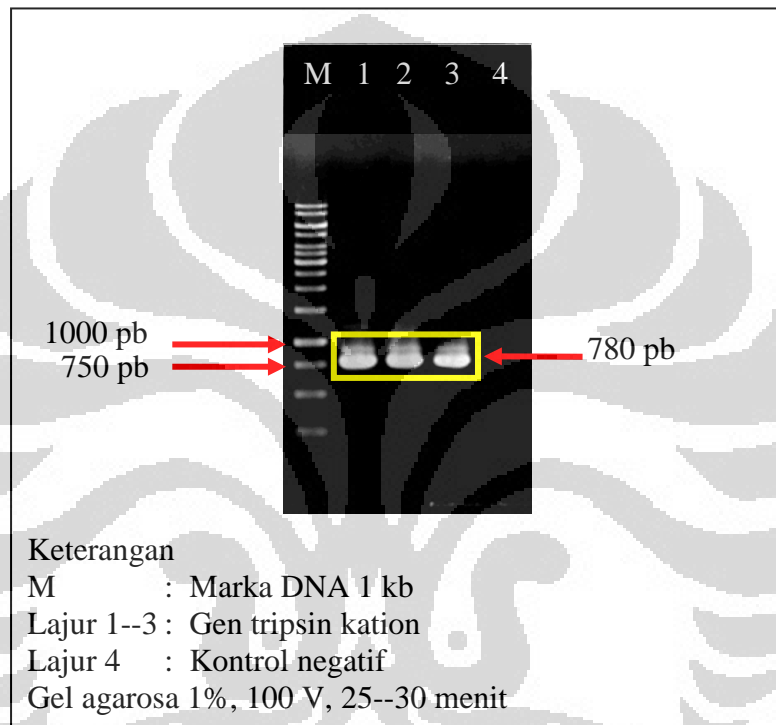


Gambar 4.1.1 Visualisasi hasil isolasi RNA pankreas sapi  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Gambar 4.1.1 menunjukkan pita RNA 28 S, 18 S dan 4--5 S. Berdasarkan pita RNA yang didapat pada Gambar 4.1.1, maka dilakukan RT-PCR.

#### 4.1.2 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

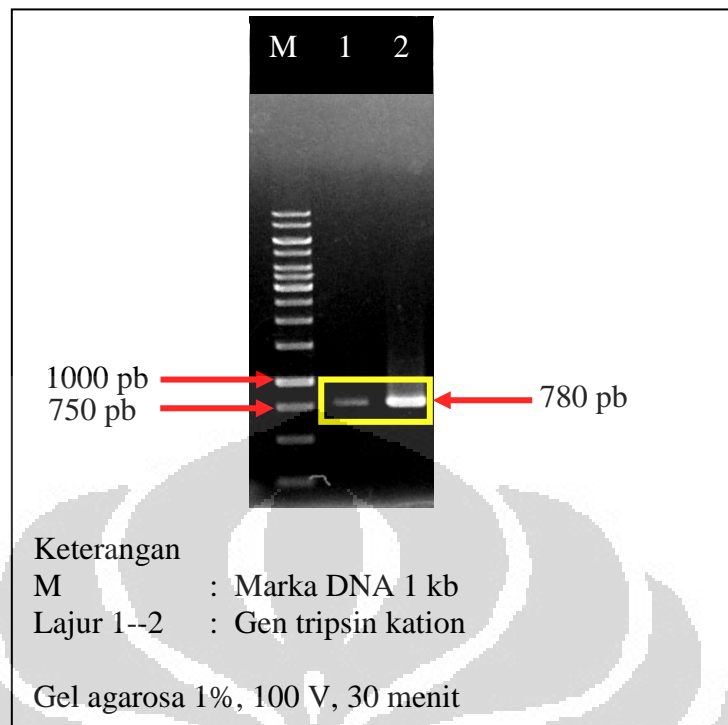
Proses sintesis cDNA menghasilkan cDNA sebanyak 105 µl dengan konsentrasi 714 ng/µl dan kemurnian sebesar 1,68 (A260/A280). Hasil elektroforesis dari RT-PCR menunjukkan bahwa sampel gen tripsin kation berhasil diamplifikasi dengan munculnya pita DNA sebesar 780 pb, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan pita DNA (Gambar 4.1.2).



Gambar 4.1.2 Hasil elektroforesis RT-PCR cDNA tripsin kation [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.3 Purifikasi PCR gen tripsin kation

Hasil purifikasi PCR gen tripsin kation di ukur nilai kemurnian dan konsentrasinya pada panjang gelombang A260/A280 menggunakan mesin *nanodrop spectrophotometer* [ND-1000]. Nilai kemurnian yang diperoleh adalah 1,88 dengan konsentrasi sebesar 342,4 ng/µl. Hasil elektroforesis dari purifikasi PCR menunjukkan bahwa sampel gen tripsin kation berhasil dipurifikasi dengan kit *Gel/PCR DNA Fragments Extraction* [Geneaid]. Hasil elektroforesis menunjukkan sampel gen tripsin kation dengan ukuran 780 pb (Gambar 4.1.3).



Gambar 4.1.3. Hasil elektroforesis gen tripsin kation setelah proses purifikasi PCR.  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.4 *A-tailing* dan ligasi gen tripsin kation

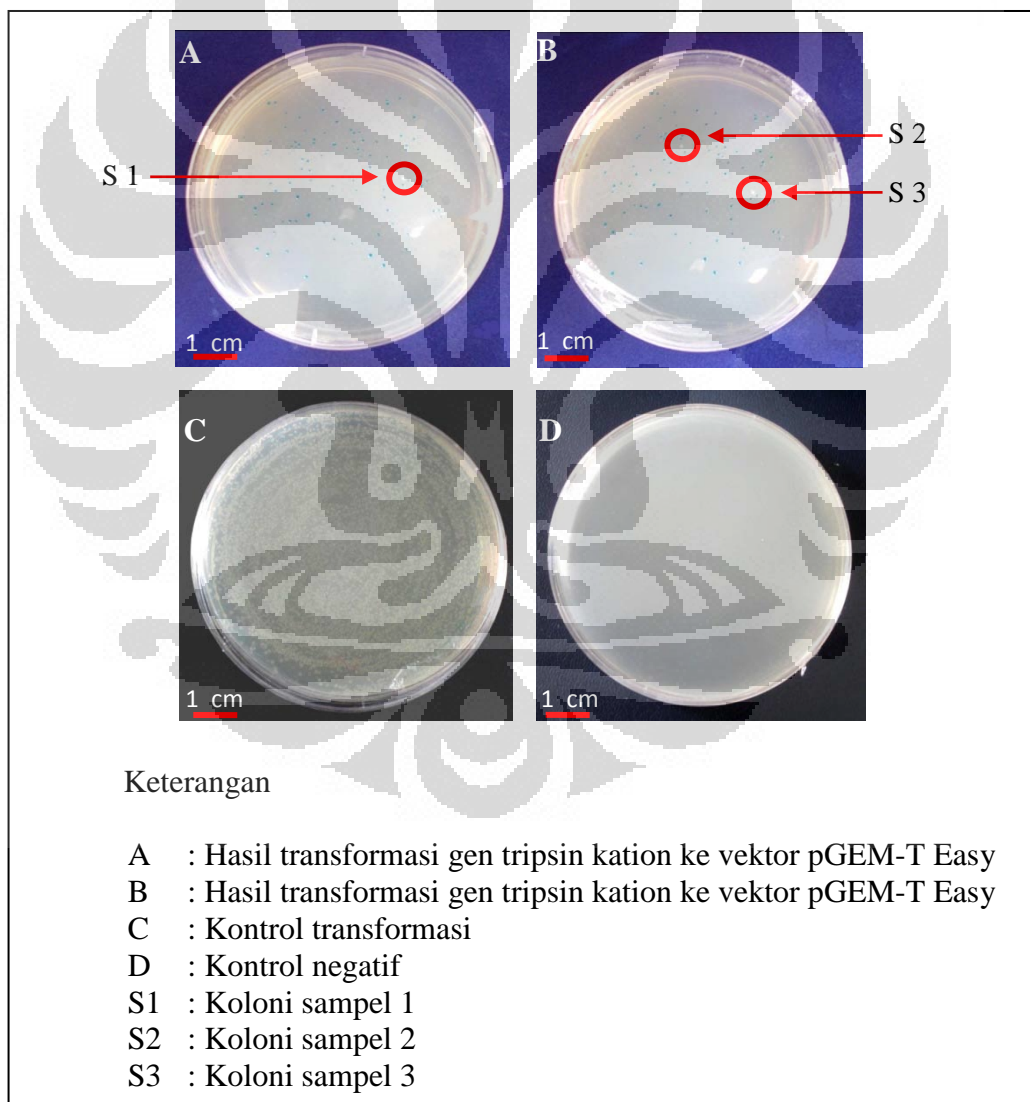
Produk hasil *A-tailing* tidak diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa karena penambahan poli-A pada ujung 3' gen tripsin kation tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ukuran pita DNA gen tripsin kation. Produk hasil *A-tailing* langsung digunakan untuk reaksi ligasi dengan vektor pGEM-T Easy. Hasil ligasi fragmen gen tripsin kation dengan vektor pGEM-T Easy tidak diverifikasi dengan elektroforesis karena langsung digunakan sebagai sumber DNA pada proses transformasi.

#### 4.1.5 Transformasi vektor rekombinan pada sel *E. coli* DH5 $\alpha$

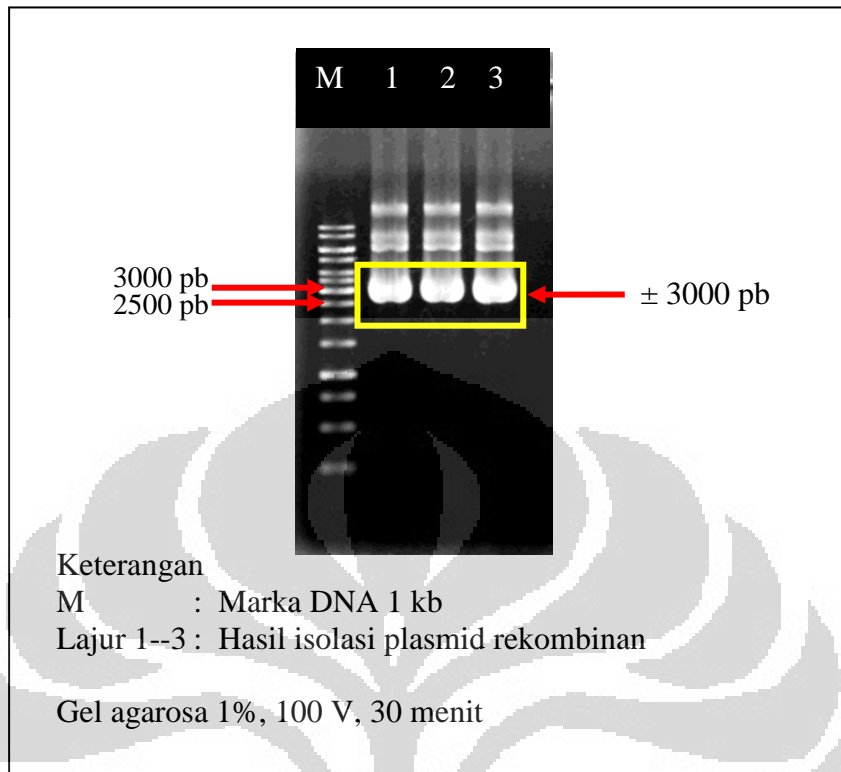
Hasil dari transformasi setelah inkubasi selama 16 jam (Gambar 4.1.5 (1)) menghasilkan nilai efisiensi transformasi sebesar  $2,68 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g pada medium seleksi A dan  $3,28 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g pada medium seleksi B (Lampiran 3). Hasil transformasi vektor rekombinan pGEM-T Easy pada sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$

menunjukkan bahwa terdapat 1 koloni berwarna putih dan 66 koloni berwarna biru pada medium seleksi putih biru A, sedangkan medium seleksi putih biru B menunjukkan adanya 2 koloni berwarna putih dan 80 koloni berwarna biru. Kontrol transformasi menggunakan plasmid pUC19 dengan konsentrasi 3 ng. Nilai efisiensi transformasi pada kontrol positif sebesar  $3,42 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g. Perhitungan nilai efisiensi transformasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tiga koloni berwarna putih yang didapat pada kedua medium A dan B berhasil diisolasi plasmid rekombinannya dan divisualisasi dengan elektroforesis untuk dianalisis lebih lanjut. Hasil elektroforesis isolasi plasmid rekombinan menunjukkan pita DNA sebesar 3000 pb (Gambar 4.1.5(2)).



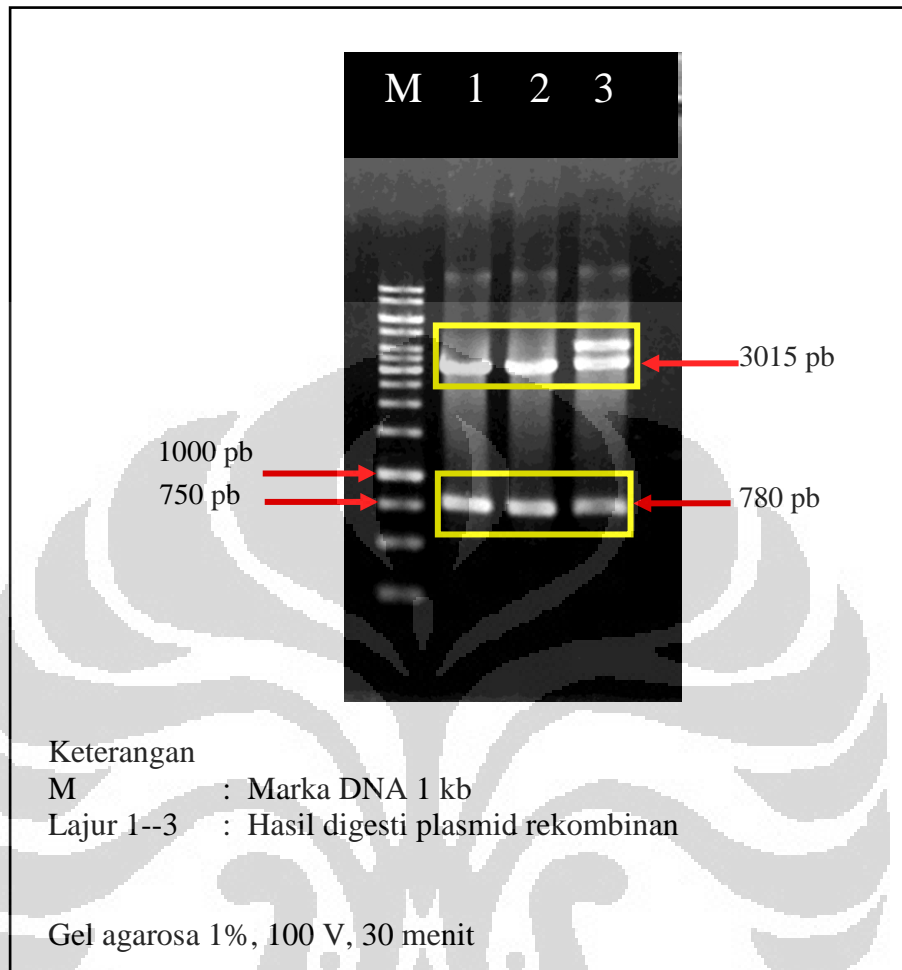
Gambar 4.1.5(1) Hasil transformasi gen tripsin kation dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  [Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.5(2) Hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.6 Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti

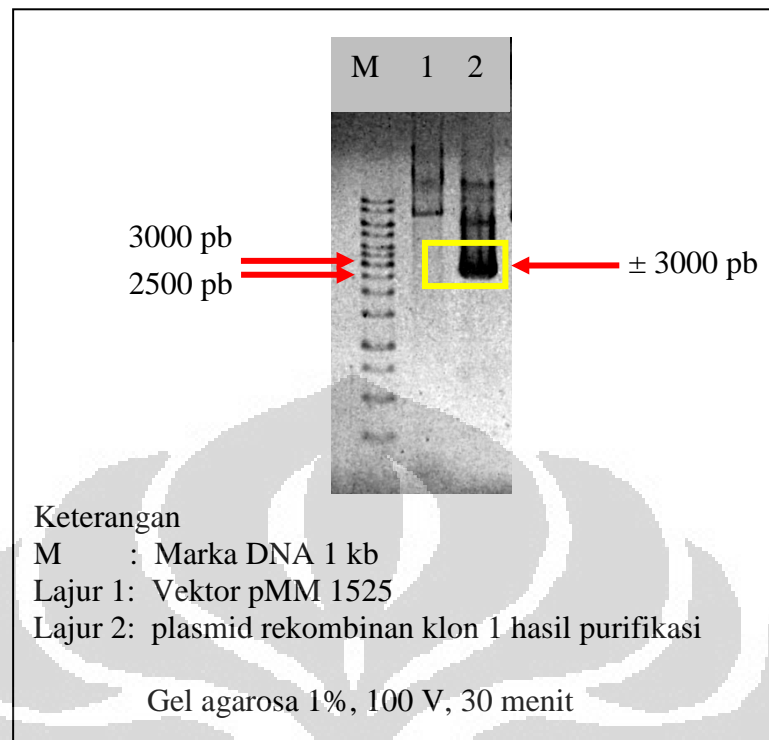
Plasmid rekombinan diverifikasi dengan metode digesti. Hasil elektroforesis dari plasmid rekombinan yang telah didigesti menunjukkan hasil positif yaitu 2 pita DNA yang terdiri dari pGEM-T Easy berukuran 3015 pb dan gen tripsin kation berukuran 780 pb (Gambar 4.1.6).



Gambar 4.1.6 Hasil digesti plasmid rekombinan pGEM T-Easy [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.7 Purifikasi plasmid rekombinan

Hasil elektroforesis purifikasi plasmid rekombinan menunjukkan ukuran pita DNA yang sama saat diisolasi yaitu 3000 pb (Gambar 4.1.7). Hasil purifikasi dihitung nilai kemurnian dan konsentrasinya pada gelombang A260/A280 dengan mesin *nanodrop* [ND-1000]. Nilai kemurnian yang diperoleh adalah 1,88 (A260/A280) dan konsentrasi sebesar 390,8 ng/ $\mu$ l.



Gambar 4.1.7 Hasil purifikasi plasmid rekombinan klon 1  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

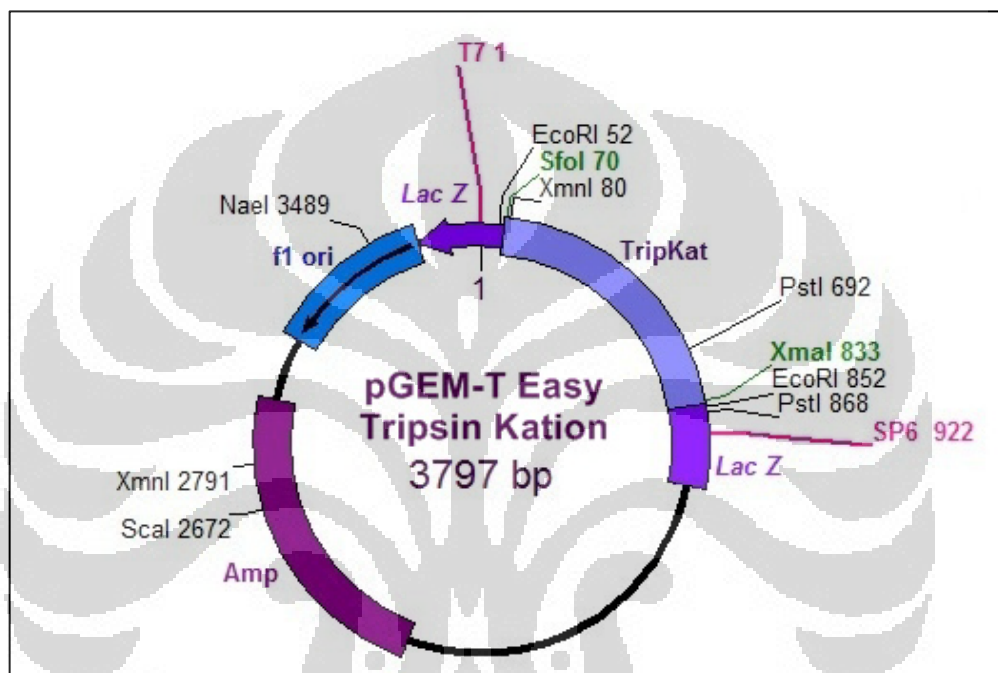
#### 4.1.8 Sekuensing dan analisis hasil sekuensing

Visualisasi hasil sekuensing yang telah dilakukan oleh perusahaan 1<sup>st</sup> Base dapat dilihat pada gambar elektroferogram menggunakan perangkat lunak Bioedit versi 7.0.9 pada Lampiran 4 dan 5. Hasil sekuensing yang didapat kemudian dikonfirmasi dengan menggunakan program BLASTN dan BLASTX pada *Gene Bank*. Hasil program BLASTN dapat dilihat pada Lampiran 6. Hasil program BLASTX dapat dilihat pada Lampiran 7. Hasil analisis sampel pada BLASTN dan BLASTX menunjukkan nilai *max ident* sebesar 99% dengan sekuen gen tripsin *Bos taurus* pada *database Gene Bank*.

#### 4.1.9 Konstruksi plasmid rekombinan pGEM-T Easy tripsin kation

Konstruksi plasmid rekombinan pGEM- T Easy tripsin kation dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak pDRAW dan PLASDRAW. Konstruksi

plasmid rekombinan pGEM- T Easy tripsin kation memiliki ukuran sebesar 3797 pb yang terdiri atas vektor pGEM- T Easy (3015 pb) dan gen tripsin kation (780 pb), serta penambahan T pada ujung 3' vektor dan A pada ujung 3' gen sisipan. Pembuatan konstruksi plasmid rekombinan pGEM- T Easy tripsin kation (Gambar 4.1.9) bertujuan untuk menggambarkan MCS, situs enzim restriksi yang berfungsi untuk penggunaan plasmid rekombinan tersebut pada tahap selanjutnya.



Gambar 4.1.9 Konstruksi plasmid rekombinan pGEM- T Easy tripsin kation [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Isolasi RNA pankreas sapi

Molekul RNA total dari pankreas sapi berhasil diisolasi dengan menggunakan kit *GeneJet RNA purification*. Proses isolasi RNA dilakukan dengan mengikuti prosedur Fermentas (2011: 1--17). Prinsip isolasi RNA adalah memisahkan molekul RNA dari molekul-molekul lain yang tidak diinginkan seperti DNA dan protein. Tahap pertama dalam pengisolasian molekul RNA adalah menggunakan larutan *lysis buffer* untuk melisiskan sel pankreas sapi.



Larutan *lysis buffer* mengandung zat guanidine tiosianat yang berperan sebagai garam *chaotropic* yang dapat melisiskan sampel sekaligus menonaktifkan RNase (Fermentas 2011: 2).

Larutan *lysis buffer* juga mengandung larutan fenol/kloroform yang dapat membuat larutan bersifat asam atau memiliki pH rendah. Setelah penambahan *lysis buffer*, sampel ditambahkan dengan etanol 96% dan membentuk 3 lapisan berbeda pada sampel. Lapisan paling atas berwarna bening, lapisan tengah berwarna putih susu, dan lapisan paling bawah berwarna merah muda. Lapisan atas disebut sebagai fase cair yang mengandung RNA, lapisan tengah adalah interfase yang mengandung fragmen DNA berukuran besar dan beberapa protein, sedangkan lapisan paling bawah adalah fase organik yang mengandung fragmen DNA berukuran 50 pb--10.000 pb dan protein (Dale & Schantz 2002: 33).

Molekul RNA yang terdapat pada fase cair dipindahkan ke dalam kolom purifikasi yang memiliki membran silika. Garam *chaotropic* dan etanol menyebabkan RNA terikat pada membran silika (Boom *dkk* 1989: 1). Zat kontaminan yang tersisa pada membran dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan *wash buffers*. Molekul RNA kemudian dielusi dengan *nuclease-free water* dibawah kondisi *buffer* garam rendah (Fermentas 2011: 2).

#### 4.2.2 Visualisasi sampel RNA total pada gel agarosa 1% mengandung formaldehid 2,2 M

Molekul RNA divisualisasi dengan memisahkan fragmen RNA total melalui elektroforesis gel agarosa 1% yang mengandung formaldehid 2,2 M berdasarkan modifikasi dari Sambrook & Russell (2001: 7.21--7.34). Gel agarosa yang mengandung formaldehid dapat mempertahankan serta menjaga kondisi molekul RNA yang terdenaturasi pada saat proses pemisahan fragmen, sehingga fragmen RNA dapat divisualisasi pada gel agarosa di bawah sinar UV. Hasil visualisasi RNA dapat dilihat pada Gambar 4.1.1 yang menunjukkan adanya tiga pita RNA yaitu 28S dan 18S rRNA, dan 4--5S RNA yang terdiri atas campuran tRNA dan rRNA (Ausubel *dkk.* 2003: 37). Hasil visualisasi pita RNA yang

didapat sangat tipis. Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa kemungkinan, diantaranya adalah degradasi sampel RNA, rendahnya kualitas sampel RNA, dan purifikasi sampel RNA yang kurang sempurna sehingga masih banyak kontaminan yang terdapat pada sampel RNA murni (Fermentas 2011: 16). Walaupun hasil visualisasi pita RNA sangat tipis, namun hasil tersebut dapat menunjukkan bahwa isolasi RNA total pankreas sapi dan pemisahan fragmen RNA dengan gel agarosa formaldehid 2,2 M berhasil dilakukan. Oleh karena itu, dilakukan tahap selanjutnya yaitu mensintesis RNA menjadi cDNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*.

#### 4.2.3 *Reverse transcription* PCR (RT-PCR)

Metode RT-PCR menggunakan modifikasi dari dua kit yaitu *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* dan *First Strand cDNA Synthesis*. Hal tersebut disebabkan karena primer Oligo(dT) yang digunakan adalah primer dari produk Fermentas, sedangkan enzim *reverse transcriptase* dari Invitrogen. Terdapat dua tahapan utama dalam metode RT-PCR yaitu sintesis cDNA dan amplifikasi gen tripsin kation dengan teknik standar PCR. Tahapan pertama adalah sintesis cDNA dari RNA total menggunakan primer oligo(dT) dan enzim *reverse transcriptase* (Fermentas 2011: 1--11; Invitrogen 2007: 1--4). Primer oligo(dT) akan menghibridisasi ekor 3' poli-A yang hanya dimiliki oleh mRNA, sehingga proses sintesis cDNA hanya terjadi pada mRNA. Sebanyak 5 µl oligo(dT) digunakan dan ditambahkan dengan 50 µl total RNA pankreas sapi kemudian diinkubasi. Inkubasi RNA *mix* pada suhu 65° C selama 10 menit bertujuan untuk denaturasi. Proses *annealing* terjadi pada suhu 42° C selama 50 menit. Saat primer oligo(dT) melekat pada untai RNA, enzim *Superscript II reverse transcriptase* akan mulai menyintesis untai pertama cDNA dan mengubah basa urasil menjadi timin. Terminasi reaksi terjadi pada suhu 70° C selama 15 menit (Invitrogen 2003: 1--4).

Konsentrasi cDNA yang didapatkan dari proses sintesis mRNA menjadi cDNA diukur menggunakan alat *nanodrop spectrophotometer* [ND-1000]. Nilai

konsentrasi cDNA yang diperoleh adalah 714 ng/μl dengan nilai kemurnian sebesar 1,68 (A260/A280). Nilai konsentrasi cDNA sel pankreas sapi yang didapat cukup besar untuk digunakan pada tahapan berikutnya yaitu amplifikasi gen tripsin kation dengan primer *cation-trypsin-forward* maupun *reverse*. Nilai kemurnian yang didapat kurang baik yaitu dibawah nilai standar kemurnian DNA yaitu 1,8--1,9 (A260/A280). Nilai kemurnian yang di bawah nilai standar kemurnian DNA yaitu 1,8--1,9 (A260/A280) menunjukkan bahwa sampel cDNA terkontaminasi oleh protein (Winfrey *dkk.* 1997: 56). Hasil cDNA kemudian digunakan sebagai *template* (0,5 μl) untuk tahapan berikutnya yaitu amplifikasi gen tripsin kation dengan primer *cation-trypsin-forward* maupun *reverse* pada mesin PCR. Hasil amplifikasi yang divisualisasi dengan elektroforesis menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran sebesar 780 pb. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen tripsin kation telah berhasil diamplifikasi (Gambar 4.1.2).

#### 4.2.4 Purifikasi PCR gen tripsin kation

Purifikasi PCR gen tripsin kation menggunakan kit *Gel/PCR DNA Fragments Extraction* [Geneaid] yang dapat mempurifikasi fragmen DNA dengan ukuran 100 pb--10.000 pb. Metode purifikasi DNA dengan kit *Gel/PCR DNA Fragments Extraction* adalah menggunakan Garam *chaotropic* yang terdapat pada larutan *DF buffer*. Garam *chaotropic* digunakan untuk mendenaturasi enzim. Fragmen DNA yang terdapat didalam garam *chaotropic* akan terikat oleh matriks serat gelas dari kolom *DF*. Zat-zat kontaminan dibersihkan dengan larutan *Wash buffers* yang mengandung etanol. Fragmen DNA dielusi dengan elusi garam rendah atau *TE buffer*. Garam, enzim, dan nukleotida yang tidak diperlukan dapat dihilangkan dari reaksi campuran pada kit tersebut tanpa perlu melalui ekstraksi fenol atau presipitasi alkohol seperti pada metode purifikasi konvensional (Geneaid 2010: 1). Nilai konsentrasi gen tripsin kation yang didapat adalah 342,4 ng/μl dengan kemurnian sebesar 1,88 (A260/A280). Pengukuran nilai konsentrasi dan kemurnian dilakukan dengan *nanodrop* [NS-1000]. Nilai kemurnian yang

didapat sesuai dengan standar kemurnian DNA yang baik yaitu berkisar antara 1,8--1,9 (A260/A280) (Winfrey *dkk.* 1997: 56).

#### 4.2.5 *A-tailing* dan ligasi gen tripsin kation

Hasil purifikasi gen tripsin kation ditambahkan poli-A pada ujung 3' nya sebelum dilakukan proses ligasi. Penambahan poli-A pada ujung 3' gen tripsin kation bertujuan untuk mempermudah proses ligasi dengan vektor pGEM-T Easy. Hal tersebut disebabkan karena pGEM-T Easy merupakan vektor yang memiliki *T-overhang* pada kedua ujung 3' nya. Proses *A-tailing* yang terpenting adalah penambahan basa A pada ujung 3' gen tripsin kation dengan dNTP *mix*. Vektor pGEM-T Easy yang memiliki *T-overhang* akan berikatan dengan *A-overhang* pada gen tripsin kation pada proses ligasi (Promega 2010: 10).

Gen tripsin kation dari hasil *A-tailing* telah digunakan sebagai DNA *template* dalam proses ligasi. Gen tripsin kation diligasikan dengan vektor pGEM-T Easy di tengah gen *lacZ*. Proses ligasi yang dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase. Menurut Cranenburgh (2004: 200), T4 DNA ligase mengkatalisis reaksi pengikatan ujung-ujung molekul DNA yang saling berkomplemen. Ligasi dilakukan pada suhu 4°C selama 16 jam karena pada suhu dan lama waktu tersebut dapat meningkatkan jumlah maksimum dari rekombinan (Promega 2010: 10--15).

#### 4.2.6 Transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$

Hasil ligasi gen tripsin kation dengan vektor pGEM-T Easy ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  tersebut telah dibuat kompeten terlebih dahulu agar mampu menyerap DNA asing ke dalam sel. Kontrol positif yang digunakan adalah hasil transformasi plasmid pUC19 dengan metode *heatshock*. Kontrol positif berfungsi untuk mengetahui kualitas sel kompeten yang digunakan. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui kemungkinan munculnya kontaminasi. Kontrol positif menggunakan pUC19 menunjukkan nilai efisiensi yaitu  $3,42 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g. Nilai efisiensi

transformasi tersebut termasuk nilai yang cukup baik yaitu diantara  $10^7$ -- $10^9$  cfu/ $\mu$ g. Kontrol negatif untuk menguji apakah sel kompeten terkontaminasi tidak menunjukkan adanya koloni yang tumbuh pada medium pertumbuhannya (Gambar 4.1.5(1)). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten termasuk ke dalam kualitas baik (Sambrook & Russell 2001: 1.25--1.26).

Hasil ligasi gen tripsin kation dengan vektor pGEM-T Easy ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$  dan di seleksi menggunakan medium seleksi LB agar yang mengandung ampisilin, X-gal, dan IPTG. Hasil seleksi koloni putih biru dapat dilihat pada Gambar 4.1.5(1). Hasil tersebut menunjukkan adanya koloni *E. coli* DH5 $\alpha$  yang tumbuh pada medium seleksi. Koloni *E. coli* yang tumbuh pada medium seleksi adalah koloni yang mengandung plasmid karena memiliki gen resistan terhadap ampisilin yang terdapat pada vektor plasmid sehingga dapat tumbuh pada medium seleksi (Promega 2010: 11). Terdapat dua macam warna koloni *E. coli* yang tumbuh pada medium seleksi, yaitu putih dan biru. Koloni berwarna putih pada medium seleksi adalah koloni yang mengandung plasmid rekombinan, sedangkan koloni yang berwarna biru adalah koloni yang mengandung plasmid non-rekombinan. Gen *lacZ* menyandi  $\beta$ -galaktosidase yang mengubah substrat X-gal yang tidak berwarna menjadi berwarna biru. Apabila fragmen gen tripsin kation menyisip di dalam gen *lacZ*, maka gen *lacZ* tidak dapat diekspresikan sehingga koloni *E. coli* menjadi berwarna putih. Sebaliknya, apabila tidak ada penyisipan pada gen *lacZ*, maka koloni yang terbentuk berwarna biru (Nicholl 2002: 133--136).

#### 4.2.7 Isolasi plasmid rekombinan

Hasil isolasi plasmid divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Hasil visualisasi dapat dilihat pada Gambar 4.1.5(2). Hasil visualisasi isolasi plasmid rekombinan yang positif ditunjukkan dengan adanya pita DNA dengan ukuran sebesar 3795 pb. Ukuran DNA tersebut didapat dari gabungan antara jumlah basa pada vektor pGEM-T Easy (3015 pb) dan fragmen gen tripsin kation (780 pb). Namun, Gambar 4.1.5(2) tidak menunjukkan ukuran DNA yang sebenarnya yaitu 3795, melainkan ukuran DNA sebesar  $\pm$  3000 pb. Salah satu

penyebab hasil visualisasi isolasi plasmid tidak menunjukkan ukuran DNA plasmid yang sebenarnya adalah karena molekul DNA plasmid berbentuk sirkular. Molekul DNA yang memiliki bentuk sirkular lebih cepat bermigrasi daripada molekul DNA yang memiliki bentuk linier. DNA plasmid yang di *running* bersama dengan marka (DNA linier) memiliki perbedaan dalam kecepatan migrasi. Hal tersebut menyebabkan pita DNA pada plasmid tidak dapat dilihat ukuran sebenarnya pada marka DNA. Ukuran DNA plasmid yang sebenarnya dapat diketahui setelah melakukan digesti oleh enzim restriksi yang situsnya berada pada daerah MCS (Martin 1996: 11).

#### 4.2.8 Verifikasi plasmid DNA rekombinan dengan digesti

Hasil isolasi plasmid rekombinan diverifikasi melalui proses digesti. Proses digesti dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *SfoI* dan *XmaI*. Enzim tersebut digunakan karena fragmen gen tripsin kation memiliki situs pemotongan enzim tersebut masing-masing pada ujung fragmen gen tripsin kation. Hasil positif dari proses digesti adalah 2 pita DNA, yaitu pita DNA dari plasmid pGEM-T Easy yang berukuran 3015 pb dan pita DNA dari fragmen gen tripsin kation yang berukuran 780 pb (Promega 2010: 8). Hasil digesti gen tripsin kation dalam plasmid pGEM-T Easy dapat dilihat pada Gambar 4.1.6.

#### 4.2.9 Purifikasi plasmid rekombinan

Purifikasi plasmid rekombinan dilakukan sebagai tahap persiapan sampel untuk sekuensing. Purifikasi plasmid rekombinan dilakukan pada klon 1. Proses purifikasi plasmid bertujuan untuk menghilangkan sisa kontaminan yang didapat selama proses isolasi, sehingga tidak mengganggu proses sekuensing. Purifikasi plasmid rekombinan dilakukan dengan menggunakan metode Sambrook & Russell (2001: 1.59--1.61). Metode purifikasi menggunakan larutan PEG/2,5 NaCl<sub>2</sub>. Prinsip kerja dari metode purifikasi yang digunakan adalah presipitasi DNA plasmid dengan penambahan larutan PEG/2,5 NaCl<sub>2</sub> dan sentrifugasi. Penambahan larutan PEG/2,5 NaCl<sub>2</sub> dan sentrifugasi akan memisahkan DNA

plasmid dengan fragmen DNA dan RNA. DNA plasmid akan terpresipitasi menjadi pelet, sedangkan molekul-molekul seperti DNA dan RNA akan terpisah dan berada pada supernatan. Hasil purifikasi dihitung nilai kemurnian dan konsentrasinya pada gelombang A260/A280 dengan mesin *nanodrop* [ND-1000]. Nilai kemurnian yang diperoleh adalah 1,88 (A260/A280) dan konsentrasi sebesar 390,8 ng/ $\mu$ l. Nilai kemurnian yang didapat sesuai dengan standar kemurnian DNA yang baik yaitu berkisar antara 1,8--1,9 (A260/A280) (Winfrey *dkk.* 1997: 56).

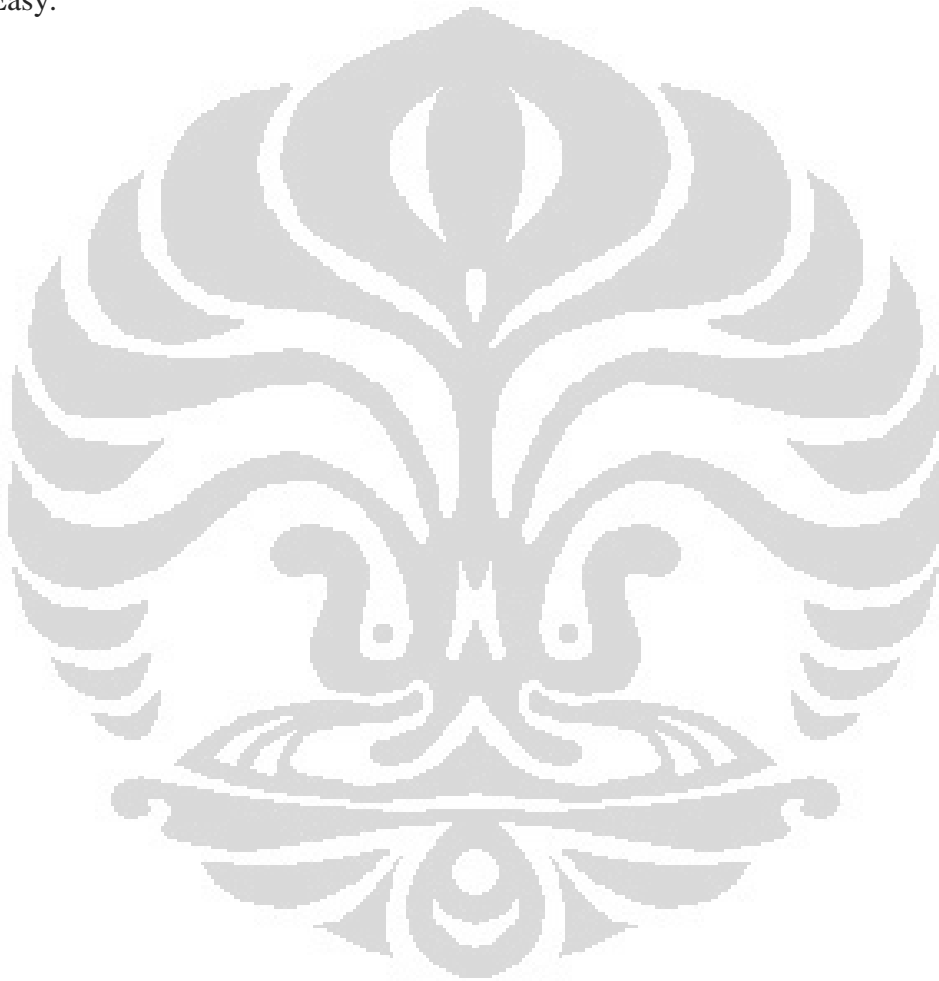
#### 4.2.10 Sekuensing dan analisis hasil sekuensing

Koloni yang menunjukkan adanya DNA sisipan ditunjukkan dengan fragmen DNA berukuran 780 pb saat verifikasi dengan teknik digesti. Verifikasi lebih lanjut dilakukan dengan metode sekuensing. Koloni yang dipilih untuk sekuensing adalah koloni klon 1. Verifikasi dengan sekuensing bertujuan untuk mengetahui kemungkinan apakah terjadi perubahan basa nukleotida atau mutasi pada DNA sisipan selama proses isolasi dan pengklonaan berlangsung. Selain bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi perubahan pada DNA sisipan, sekuensing plasmid DNA rekombinan juga bertujuan untuk memastikan bahwa ujung-5' maupun ujung-3' DNA sisipan telah terhubung (fusi) dengan tepat pada fragmen vektor pGEM-T Easy.

Hasil sekuensing berupa elektroferogram dapat dilihat pada Lampiran 4 dan 5. Elektroferogram memperlihatkan puncak sinyal yang cukup baik. Salah satu indikasi hasil elektroferogram yang baik ditunjukkan dengan tajamnya puncak sinyal dan tidak adanya puncak sinyal yang bertumpuk (Applied Biosystem 2002: 7--11). Hasil sekuensing yang didapat kemudian dikoreksi basa nukleotidanya baik elektroferogram *forward* maupun *reverse*. Basa nukleotida *forward* dan *reverse* yang telah dikoreksi kemudian di *alignment* menggunakan program Bioedit. Hasil *alignment* dikonfirmasi menggunakan program BLASTN dan BLASTX pada *Gene Bank*.

Hasil konfirmasi BLASTN gen tripsin kation menunjukkan *max ident* sebesar 99% dengan gen tripsin kation pada *Bos taurus* (Lampiran 6), sedangkan

hasil konfirmasi BLASTX menunjukkan *max ident* sebesar 99% dengan protein tripsin kation *Bos taurus* (Lampiran 7). *Max ident* sebesar 99% menunjukkan bahwa 99% urutan basa nukleotida pada sampel identik dengan urutan basa nukleotida gen tripsin kation pada *Bos taurus* (Claverie & Notradame 2007: 416). Hasil tersebut merupakan hasil konfirmasi yang dapat dipercaya, karena memiliki nilai kesamaan sebesar 99%. Berdasarkan hasil tersebut, telah dapat dipastikan bahwa fragmen gen tripsin kation telah berhasil diklon ke dalam vektor pGEM-T Easy.





## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Fragmen gen tripsin kation berhasil diisolasi dari pankreas sapi dan diklon ke dalam vektor pGEM-T Easy dan vektor rekombinan yang terbentuk berhasil ditransformasi ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan subkloning gen tripsin kation ke dalam sistem ekspresi ekstraselular bakteri Gram positif dan uji aktivitas tripsin kation.

## DAFTAR REFERENSI

- Applied Biosystem. 2002. *Automated DNA sequencing: Chemistry guide*. Applera Corporation, Foster City: iii + 1-1--7-65 + A-14 + B-1 + C-3 +D-5 + E-10 + Index-6.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxxviii + 12.10 + A1.29 + 17 hlm.
- Badan Pusat Statistik. 2012. Hasil sensus penduduk 2010. 1 hlm.  
<http://dds.bps.go.id/eng/aboutus.php?sp=0>. 3 Juni 2012, pk. 12.04.
- Bankamp, B., J.M. Fontana, W.J. Bellini, & P.A. Rota. 2008. Adaptation to cell culture induces functional differences in measles virus proteins. *Virology Journal* **5**: 129--141.
- Berg, J.M., J.L. Tymoczko, & L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, San Fransisco: viii + 1514 hlm.
- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, & P.M.E. Werthem. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(3): 495--503.
- Brown, T.A. 2002. *Genomes*. 2nd ed. Wiley-Liss, Oxford: x + 471 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Ed. ke-5. Terj. Dari *Biology*. 5th ed, oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, Andri, W.F. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2010. *Biologi*. Ed. ke-8. Terj. Dari *Biology*. 8th ed, oleh Wulandari. Erlangga: xii + 571 hlm.
- Cherry, J.M. 1995. Computer manipulation of DNA and protein sequences. Dalam: Ausubel, F.M., R. Brent., R.E. Kingston., D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., California: 7.7.1-7.7.23.
- Claverie, J.M. & C. Notradame. 2007. *Bioinformatics for dummies*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xx + 452 hlm.

- Cranenburgh, R.M. 2004. An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* **65**: 200--202.
- Dale, J.W. & M.V.Schantz. *From genes to genomes*. 2002. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xi + 360.
- Davis, L.G., W.M. Kuehl & J.F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwjk: xiii + 763 hlm.
- Fairbanks, D. J. & W. R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Brooksdole Publishing Company, New York: xix + 820 hlm.
- Fermentas. 2011. *GeneJet RNA purification kit*. Fermentas Inc., New York: 17 hlm.
- Finnzymes. 2007. *Phusion™ high fidelity DNA polymerase*. New England Biolabs Inc., United States: 4 hlm.
- Freifelder, D. 1987. *Molecular biology*. Jones and Barlett Publisher, Boston: xxiv + 834 hlm.
- Geneaid. 2010. *Gel/PCR DNA fragments extraction kit protocols*. Geneaid Biotech Ltd., Taipei: 3 hlm.
- Griffiths, A.J.F., W.M. Gelbart, J.H. Miller & R.C. Lewontin. 1999. *Modern genetic analysis*. W.H. Freeman Company, New York: xvi + 675 hlm.
- Hall, T. 2001. *Bioedit version 5.0.6*. North Carolina State University Press, New York: 190 hlm.
- Hanquier, J., Y. Sorlet, D. Desplancq, L. Baroche, M. Ebtinger, J.F. Lefevre, F. Pattus, C.L. Hershberger, & A.A. Vertes. 2002. A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2): 1108--1113.
- Invitrogen. 2003. *Superscript II reverse transcriptase*. Invitrogen, Inc., USA: 4 hlm.
- Invitrogen. 2007. *SuperScript™ first-strand synthesis system for RT-PCR*. Invitrogen, Inc., USA: 4 hlm.
- Karcher, S.J. 1995. *Molecular biology: A project approach*. Academic Press, San diego: xxi + 280 hlm.

- Kendall, L.V & L.K. Riley. 2000. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Contemporary topics* **39**(1): 42.
- Kim, N.S., H.Y. Yu, N.D. Chung, Y.J. Shin, T.H. Kwon, & M.S. Yang. 2010. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expression & Purification* **76**(1): 121--126.
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Kunitz, M. 1939. Purification and concentration of enterokinase. *The Journal of General Physiology*: 447--450.
- Lago, P.M., H.E. Gary Jr, L.S. Perez, V.Caceres, J.B. Olivera, R.P. Puentes, M.B. Corredor, P. Jimenez, M.A. Pallansch, & R.G. Cruz. 2003. Poliovirus detection in wastewater and stools following an immunization campaign in Havana, Cuba. *International Journal of Epidemiology* 2003 **32**: 772--777.
- Lewis, R. 2003. *Human genetic: Concepts and applications*. 5th ed. The McGraw-Hills Company Inc., Boston: xviii + 454 hlm.
- Maroux, S., J. Barrati, & P. Desnuelle. 1971. Purification and specificity of porcine enterokinase. *The Journal of Biological Chemistry* **246**(16): 5031-5039.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: Nucleic acid*. Bios Scientific Publisher, Ltd, Oxford: xiii + 175 hlm.
- NEB. 2012. Double digest finder. 1 hlm.  
<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>. 2 Juni 2012, pk.12.14.
- Nicholl, D.S.T. 2002. *An introduction to genetic engineering*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York: xi + 292 hlm.
- Paolella, P. 1998. *Introduction to molecular biology*. WCB McGraw- Hill Companies, Inc., Massachussets: xiii + 241 hlm.
- Passarge, E. 2007. *Color atlas of genetics*. 3rd ed. Thieme Sturgart, New York: x + 486 hlm.
- Phelan, M.C. 1998. *Current protocols in cell biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York: 1.1.1--1.1.10.
- Primorse S.B., R.M. Twyman, & R.W Old. *Principles of gene manipulation*.

2001. 6th ed. Blackwell Science Ltd., Maklen: vii + 319 hlm.
- Promega. 2010. *pGEM-T Easy and pGEM-T Easy vector system*. Promega Corporation, New York: 27 hlm.
- Raven, P. H. & G. B. Johnson. 2002. *Biology*. McGraw-Hill Companies, Inc., New York: xxix + 1238 hlm
- Russell, P. J. 1994. *Fundamental of genetics*. Harper Collins College Publishers, New York: xvi + 528 hlm.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* vol 2. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xvii + 3.4--14.53 + 1.44.
- Schwarzer, J., E. Rapp, R. Henning, Y. Genzel, I. Jordan, V. Sandig, & U. Reichl. 2009. Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* **27**: 4325--4336.
- Seidman, C.E., K. Struhl, J. Sheen, & T. Jessen. 1997. *Escherichia coli*, plasmids, and bacteriophages. *Current Protocols in Molecular Biology* : 1.8.1--1.8.10.
- Singleton, P. & Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of microbiology and molecular microbiology*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xi + 895 hlm.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xix + 840 hlm.
- Strachan, T. & A.P. Read. 1999. *Human molecular genetics 2*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxiii + 576 hlm.
- Talaro, K.P. 2008. *Foundations in microbiology*. 6th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xxi + 834 hlm.
- Tamarin, R.H. 2002. *Principles of genetics*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xvi + 609 hlm.
- Travis, J. & R.C. Roberts. 1969. Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization. *Biochemistry* **8**(7): 2884--2889.
- Voytek, P. & E.C. Gjessing. 1970. Studies of an anionic trypsinogen and its active enzyme from porcine pancreas. *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 508--516.

- Weaver, R.F. & P.W. Hedrick. 1997. *Genetics*. 3rd Ed. Wm.C.Brown Publishers, Dubuque: xvii + 638 hlm.
- Winfrey, M.R., M.A. Rott, & A.T. Wortman. 1997. *Unraveling DNA: molecular biology for the laboratory*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xxviii + 369 hlm.
- Wong, D.W.S. 1997. *The ABC of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Yamaya, M., M. Hosoda, T. Suzuki, N. Yamada, & H. Sasaki. 2002. Human airway cell culture. *Methods in Molecular Biology* **188**: 1--11.
- Zhiming Tu, Guangyuan He, Kexiu X. Li, Mingjie J. Chen, Junii Chang, Ling Chen, Qing Yao, Dongping P. Liu, Huan Ye, Jiantao Dhi, & Xuqian Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid tranformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**(1): 113--120.

## Lampiran 1

Komposisi dari preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian

<b>Reagen</b>	<b>Komposisi dan cara pembuatan</b>
Proteinase K (25 mg/ml)	Bubuk proteinase K dilarutkan dengan 1 ml <i>mili-Q water</i> .
Gel agarosa 1% dengan 2,2 M formaldehid	12,05 ml TAE 1x dan 0,95 ml 2,2M formaldehid dicampur dengan 0,13 g bubuk agarosa, lalu dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih.
<i>Loading buffer</i>	1 $\mu$ l 10x MOPS <i>buffer</i> , 2 $\mu$ l formaldehid, dan 3 $\mu$ l sampel RNA dicampur dan diinkubasi pada suhu 85° C selama 10 menit.
<i>Loading dye 6x</i>	0,6 ml Gliserol 30 %, 0,005 g brom fenol biru, dan 0,005 g sian xilenol dilarutkan dalam 2 ml <i>mili-Q water</i> .
<i>Buffer MOPS 10x</i>	41,8 g MOPS dalam 700 ml DEPC <i>water</i> dengan pH 7, 20 ml sodium asetat 1M, dan 20 ml EDTA (pH8) 0,5M dilarutkan dalam 1 L DEPC <i>water</i> dan disterilisasi dengan filter
<i>Alkaline Lysis Solution I</i>	50mM glukosa, 25mM Tris-Cl (pH 8), dan 10 mM EDTA (pH 8) dilarutkan dalam 100mL <i>mili-Q water</i> .
<i>Alkaline Lysis Solution II</i>	0,2N NaOH dan 1% (w/v) SDS dilarutkan dalam 1,2 ml <i>mili-Q water</i>
<i>Alkaline Lysis Solution III</i>	60 ml potasium asetat 5M dan 11,5 ml larutan asam asetat glasial dicampur dengan 28,5 ml <i>mili-Q water</i> .
Rnase A (Dnase free), Boehringer	Rnase A (Dnase free), Boehringer 1 mg/ml dalam 50 mM Tris HCl (pH 7,5)
Tris HCl 1 M pH 8	12,1 g tris-base ditambahkan HCl hingga

Lanjutan

	volume 100 ml, disterilisasi menggunakan filter.
Antibiotik ampisilin 100 mg/ml	100 mg ampisilin dilarutkan dalam 1 ml <i>mili-Q water</i>
Etidium bromida	50 µl stok EtBr dicampur dengan 500 ml <i>mili-Q water</i> .
TB Buffer	1,5 g PIPES, 1,1 g CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, dan 9,3 g KCl dilarutkan dalam <i>mili-Q water</i> sebanyak 450 ml, pH 6,7. MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O sebanyak 5,45 g dilarutkan dalam <i>mili-Q water</i> hingga volume 500 ml. Larutan disterilisasi menggunakan filter.
Gel agarosa 1%	0.25 g bubuk agarosa dilarutkan dengan 25 ml TAE lalu dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih.
Marka 1 kb Ladder	Sebanyak 10 µl <i>loading dye</i> 6x dicampur dengan 12 µl <i>stock</i> marka DNA, kemudian ditambahkan ddH <sub>2</sub> O steril hingga volume mencapai 60 µl
IPTG	23,8 mg IPTG dilarutkan dalam <i>mili-Q water</i> sebanyak 1 ml kemudian tabung dilapisi dengan alumunium foil.
X-Gal	40 mg X-gal dilarutkan dalam DMSO sebanyak 1 ml kemudian tabung dilapisi dengan alumunium foil.

[Sumber: Sambrook & Russel 2001: A1.1--A2.12]



## Lampiran 2

### Komposisi dan cara pembuatan medium LB, SOB, dan SOC

---

#### Komposisi:

---

Trypton

*Yeast Extract*

NaCl

KCl 250 mM

Glukosa 1M

pH 7

---

#### Cara pembuatan medium LB cair :

Satu liter medium LB dibuat dengan melarutkan 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, dan 10 g NaCl dengan *mili-Q water*. Campuran dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer*. Tingkat keasaman (pH) larutan diatur hingga mencapai pH 7 dengan menambahkan NaOH 5M. Larutan LB cair kemudian disterilisasi pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

---

#### Cara pembuatan medium LB agar:

Medium LB agar dibuat seperti cara di atas, tetapi ditambahkan 15g/L bubuk agar sebelum diautoklaf. Larutan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

---

#### Cara pembuatan SOB cair:

Satu liter medium SOB cair dibuat dengan melarutkan 20 g tripton, 5 g *yeast extract*, dan 0,585 g NaCl, dan 0,186 g KCl dengan *mili-Q water*. Campuran dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer*. Larutan SOB cair kemudian disterilisasi pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

---

Lanjutan

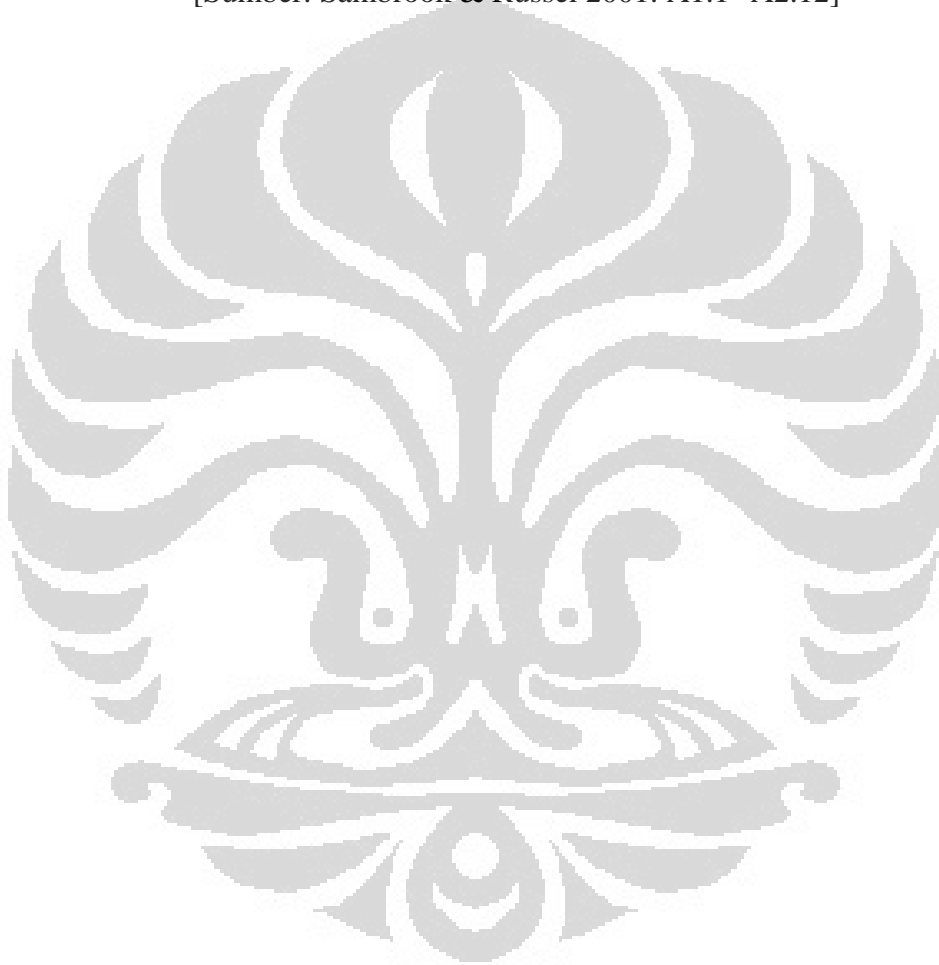
---

Cara Pembuatan SOC cair:

Medium SOC memiliki komposisi yang hampir sama dengan medium SOB. Sebanyak 10 ml/L larutan glukosa 1M steril ditambahkan pada medium SOB yang sudah diautoklaf dan sudah memiliki suhu sekitar 60° C. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

---

[Sumber: Sambrook & Russel 2001: A1.1--A2.12]



### Lampiran 3

#### Pengukuran efisiensi transformasi

$$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{volume transformasi}}{\text{Volume kultur} \times \text{Konsentrasi DNA}}$$

1. Efisiensi transformasi sel kompeten dengan vektor PUC 19 =  $\frac{513 \times 1 \times 200}{100 \times 3 \times 10^{-6}}$   
=  $3,42 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g

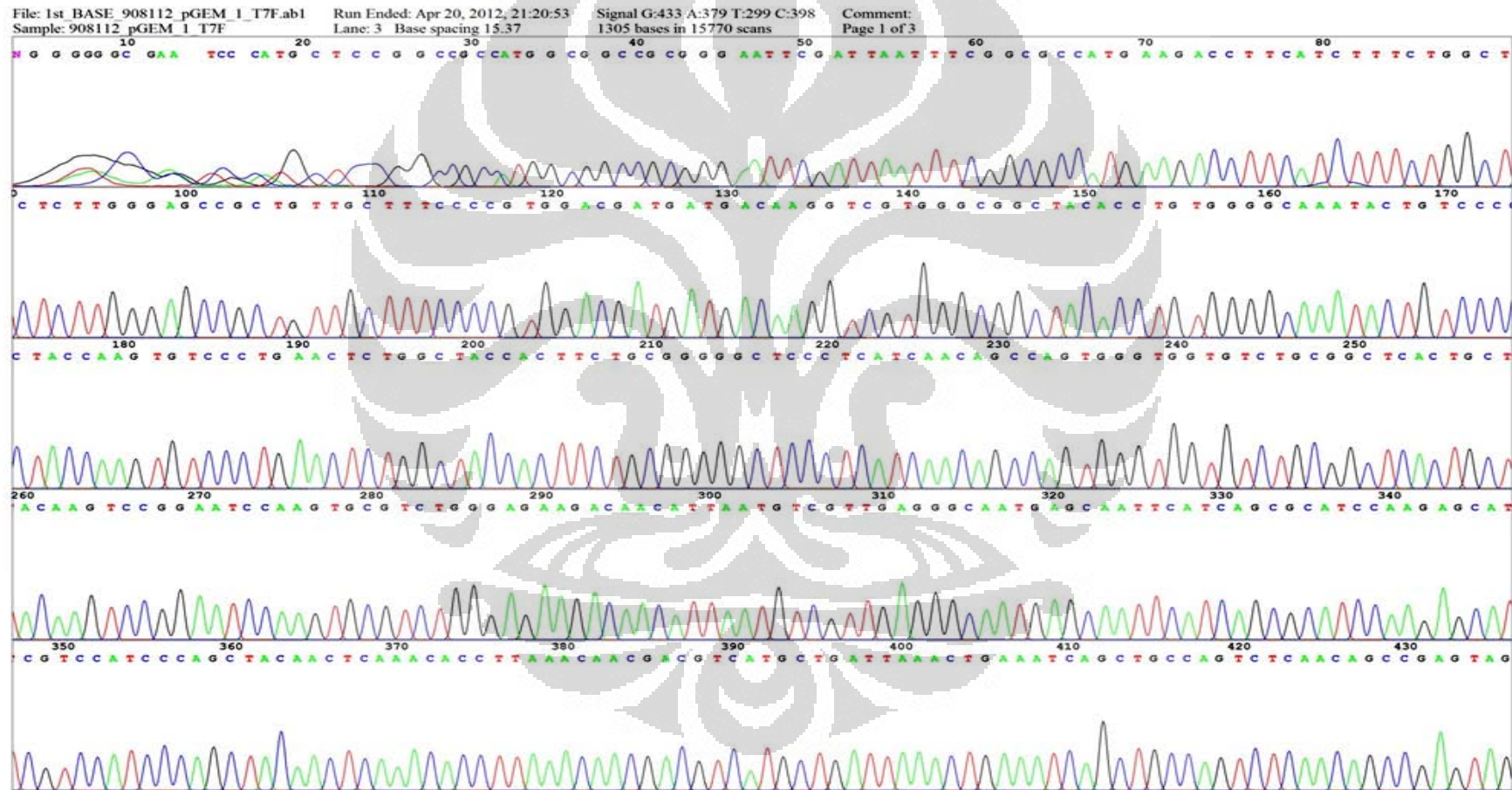
2. Efisiensi transformasi gen tripsin kation pada pGEM-T Easy di medium seleksi  
A =  $\frac{67 \times 1 \times 200 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l} \times 5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}}$   
=  $2,68 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g

3. Efisiensi transformasi gen tripsin kation pada pGEM-T Easy di medium seleksi  
B =  $\frac{82 \times 1 \times 200 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l} \times 5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}}$   
=  $3,28 \times 10^3$  cfu/ $\mu$ g

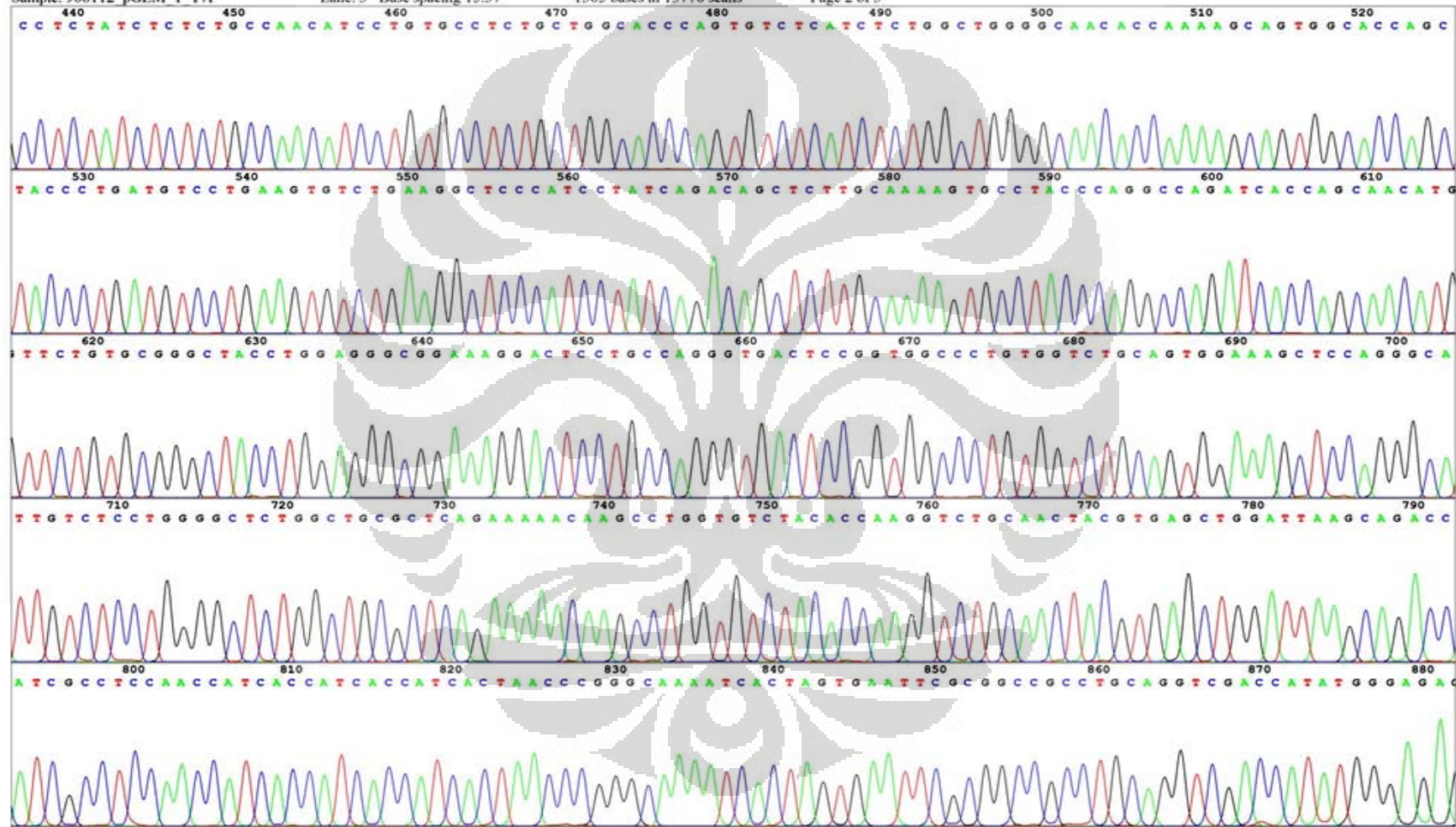
[Sumber: Zhimming tu *dkk.* 2005: 117]

## Lampiran 4

Elektroferogram hasil sekuensing gen tripsin kation pada plasmid pGEM T-*Easy* dengan primer T7 *Forward*

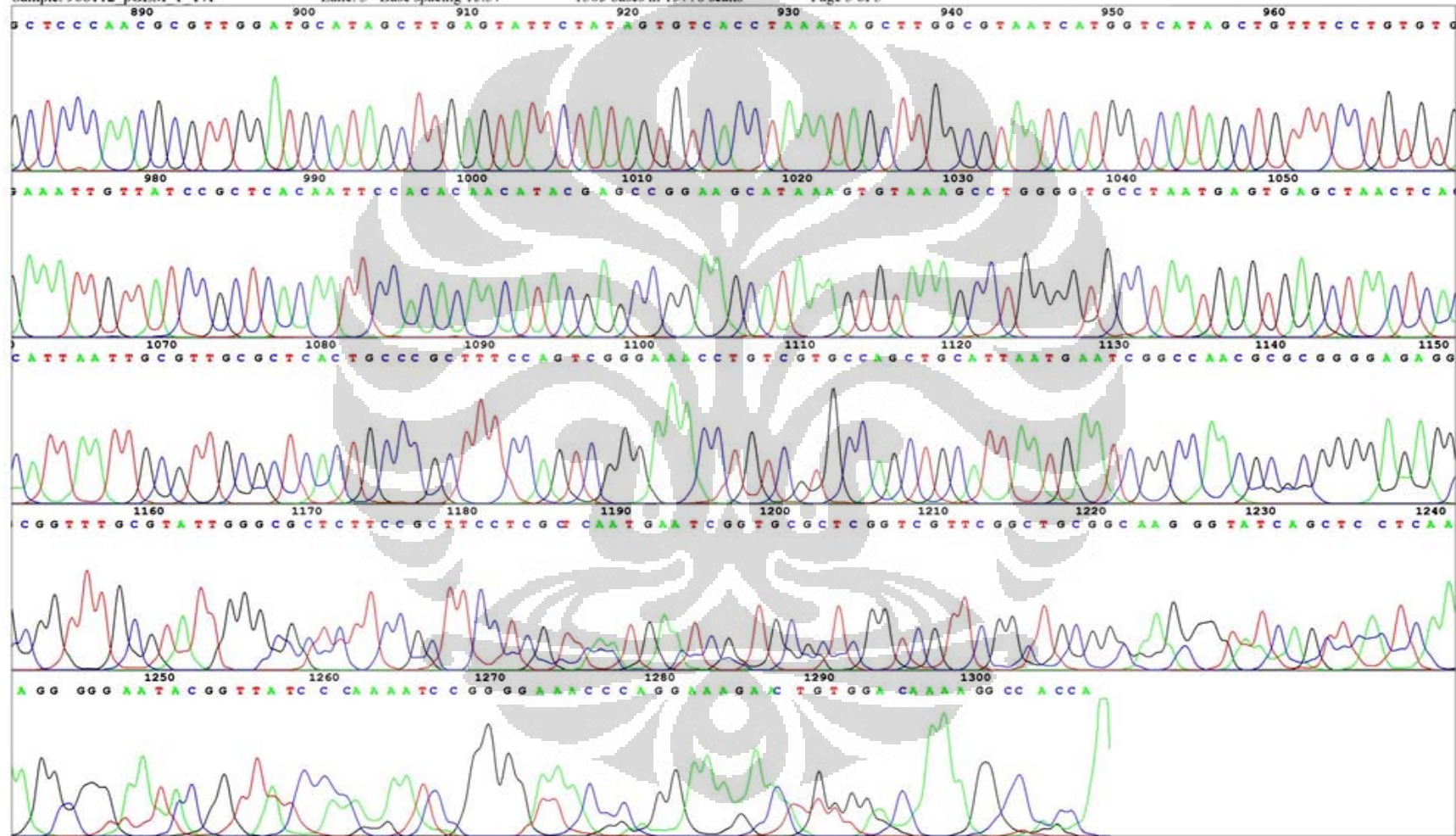


File: 1st\_BASE\_908112\_pGEM\_1\_T7F.ab1 Run Ended: Apr 20, 2012, 21:20:53 Signal G:433 A:379 T:299 C:398 Comment:  
Sample: 908112\_pGEM\_1\_T7F Lane: 3 Base spacing 15.37 1305 bases in 15770 scans Page 2 of 3



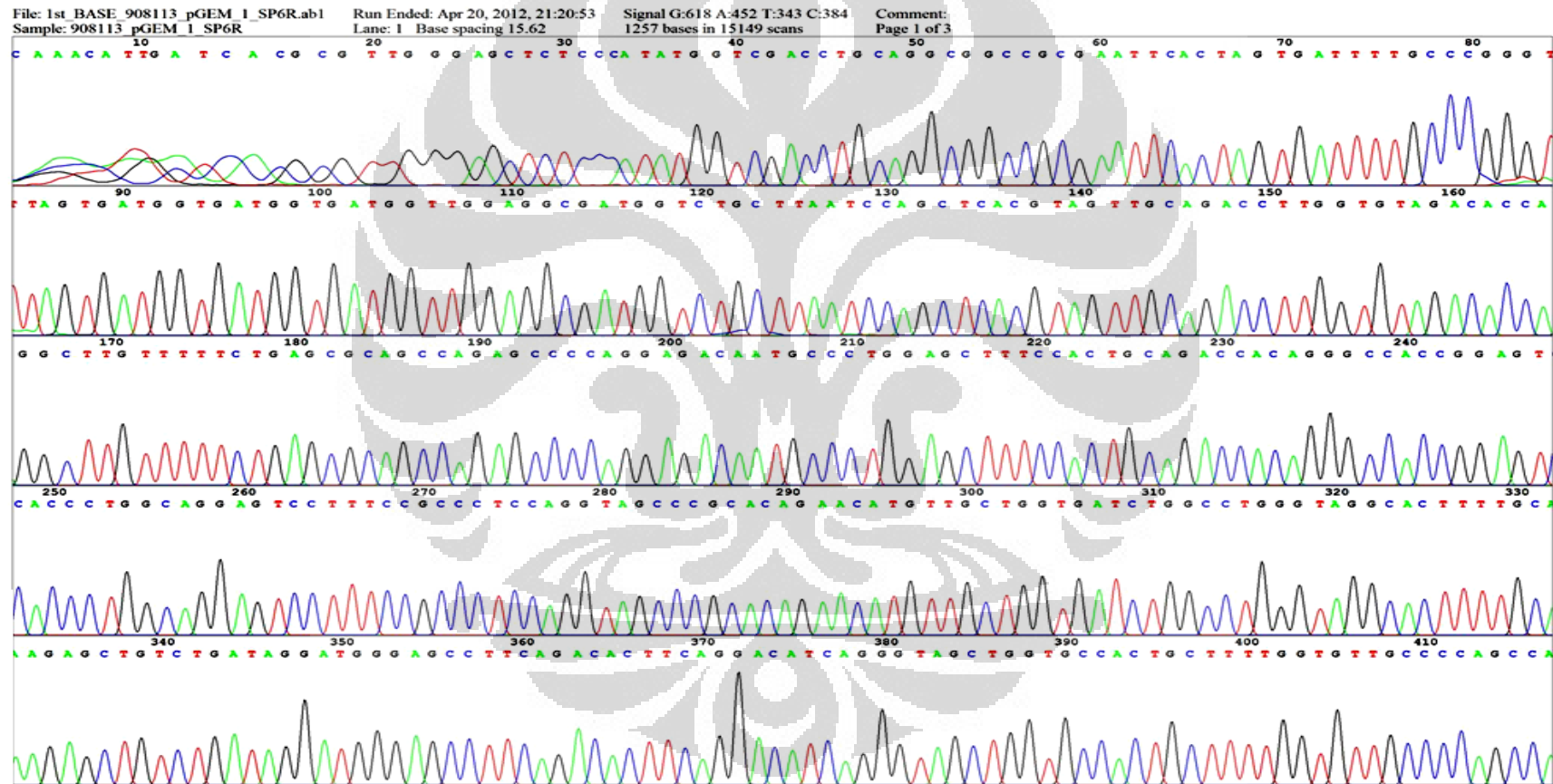
Universitas Indonesia

File: 1st BASE\_908112\_pGEM\_1\_T7F.ab1 Run Ended: Apr 20, 2012, 21:20:53 Signal G:433 A:379 T:299 C:398 Comment:  
Sample: 908112\_pGEM\_1\_T7F Lane: 3 Base spacing 15.37 1305 bases in 15770 scans Page 3 of 3

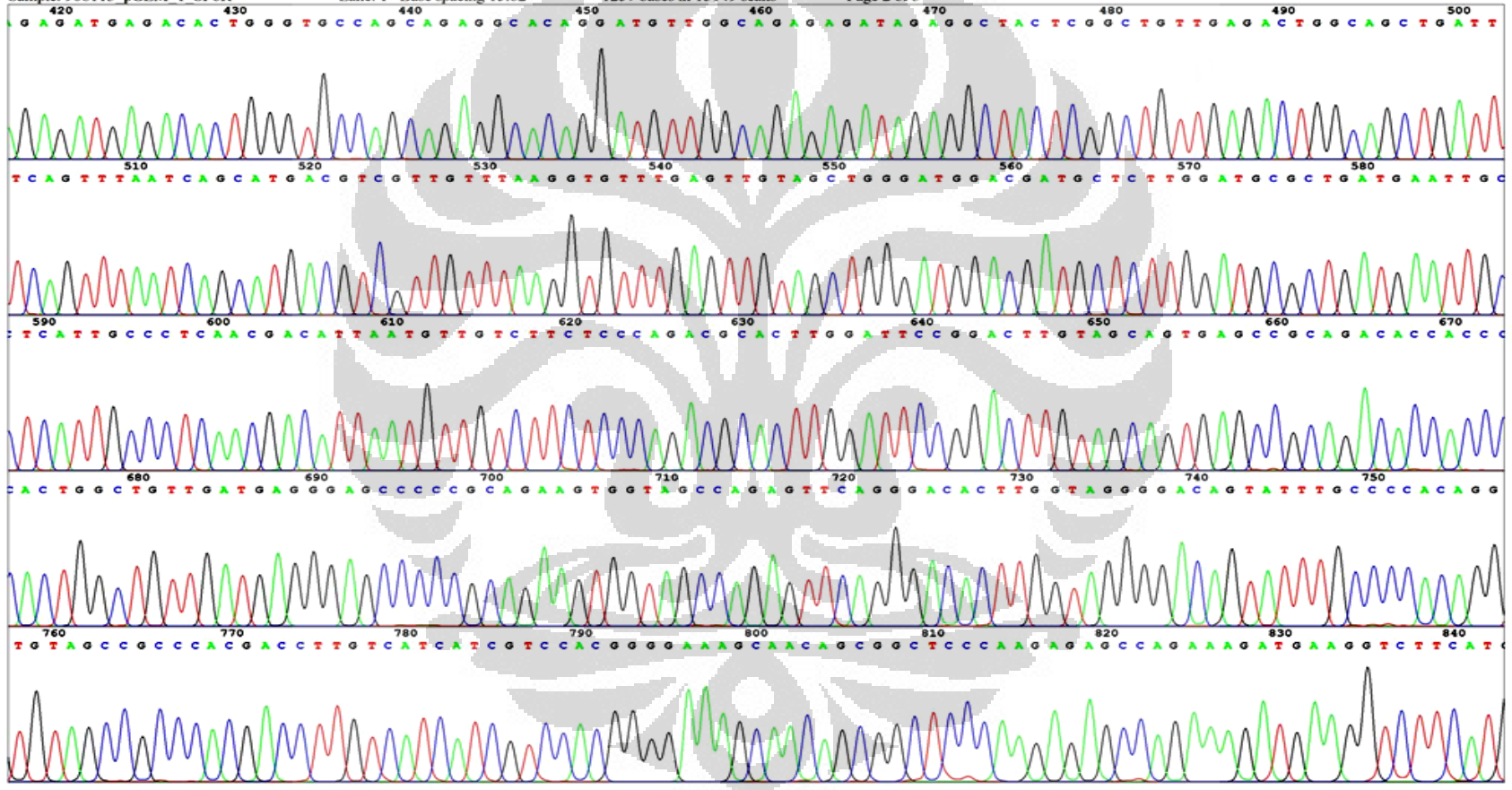


Lampiran 5

Elektroferogram hasil sekuensing gen tripsin kation pada plasmid pGEM T-Easy dengan primer SP6 Reverse

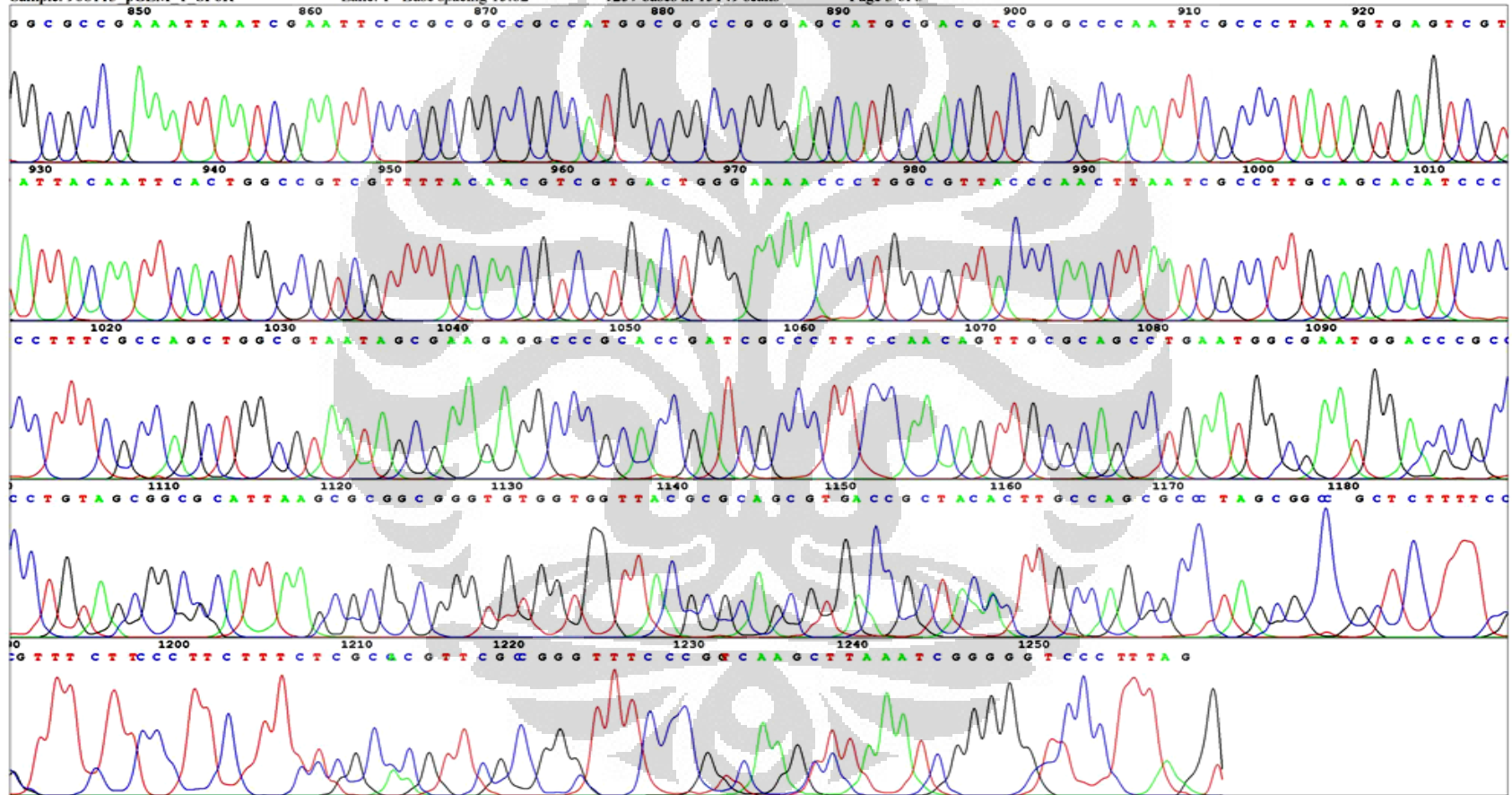


File: 1st\_BASE\_908113\_pGEM\_1\_SP6R.ab1 Run Ended: Apr 20, 2012, 21:20:53 Signal G:618 A:452 T:343 C:384 Comment:  
Sample: 908113\_pGEM\_1\_SP6R Lane: 1 Base spacing 15.62 1257 bases in 15149 scans Page 2 of 3





File: 1st\_BASE\_908113\_pGEM\_1\_SP6R.ab1 Run Ended: Apr 20, 2012, 21:20:53 Signal G:618 A:452 T:343 C:384 Comment:  
Sample: 908113\_pGEM\_1\_SP6R Lane: 1 Base spacing 15.62 1257 bases in 15149 scans Page 3 of 3



Lampiran 6

Hasil analisis sekuen gen tripsin kation dengan program BLASTN

**BLAST®** Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - TDEE9BU001N

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

**pGEM-Tripcat klon 1**

Query ID: lcl|59303  
 Description: pGEM\_1\_T7 Forward  
 Molecule Type: nucleic acid  
 Query Length: 780

Database Name: nr  
 Description: All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
 Program: BLASTN 2.2.26+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

**Graphic Summary**

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Purple
>=200	Red

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

**Sequences producing significant alignments:**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NM_001113727.1	<b>Bos taurus cationic trypsin (LOC780933), mRNA &gt;gb BC134</b>	1351	1351	94%	0.0	99%	UGM
BC146041.1	Bos taurus T cell receptor, beta cluster, mRNA (cDNA clone M	1334	1334	94%	0.0	99%	UGM
D38507.1	Bos taurus mRNA for activation peptide and pancreas cationi	1332	1332	93%	0.0	99%	UGM
XM_866593.4	PREDICTED: Bos taurus cationic trypsin-like, transcript vari	1317	1317	94%	0.0	99%	GM
NM_001162891.1	Sus scrofa trypsinogen (LOC100302368), mRNA >gb FJ9695	760	760	94%	0.0	85%	UGM
XM_002721844.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus trypsin 4-like (LOC10033	667	667	94%	0.0	83%	GM
XM_001487935.1	PREDICTED: Equus caballus cationic trypsin-3-like (LOC1000	660	660	94%	0.0	83%	GM
XM_002721843.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cationic trypsinogen-like	656	656	94%	0.0	83%	GM
XM_002924158.1	PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca cationic trypsin-like (LC	652	652	94%	0.0	83%	GM
XM_002751916.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cationic trypsin-3-like (LOC10	616	616	94%	1e-172	82%	GM
BC061093.1	Mus musculus RIKEN cDNA 2210010C04 gene, mRNA (cDNA f	521	521	94%	2e-144	80%	UEGM
NM_023333.4	Mus musculus RIKEN cDNA 2210010C04 gene (2210010C04f	521	521	94%	2e-144	80%	UEGM

Lampiran 7

Hasil analisis sekuen gen tripsin kation dengan program BLASTX

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastx/ Formatting Results - TXA6Z4AE012

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

**pGEM\_1\_T7Forward (780 letters)**

Query ID: Icl|22868  
 Description: pGEM\_1\_T7Forward  
 Molecule type: nucleic acid  
 Query Length: 780

Database Name: nr  
 Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects  
 Program: BLASTX 2.2.26+ Citation

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports]

**Graphic Summary**

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query 1 150 300 450 600 750

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer P PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NP_001107199.1	cationic trypsin precursor [Bos taurus] >sp P00760.3 TR	505	505	94%	7e-180	99%	G M P
XP_871686.3	PREDICTED: cationic trypsin isoform 1 [Bos taurus] >refl	503	503	94%	8e-179	98%	U G M
1FOT_A	Chain A, Bovine Trypsin Complexed With Rpr131247 >pc	499	499	93%	1e-177	99%	S P
1OPH_B	Chain B, Non-Covalent Complex Between Alpha-1-Pi-Pitt	498	498	93%	3e-177	99%	S
1ZZZ_A	Chain A, Trypsin Inhibitors With Rigid Tripeptidyl Aldehyd	489	489	91%	2e-173	99%	S P
1TGS_Z	Chain Z, Three-Dimensional Structure Of The Complex Be	474	474	88%	1e-167	99%	S P
1G3B_A	Chain A, Bovine Beta-Trypsin Bound To Meta-Amidino Sc	472	472	87%	4e-167	99%	S P
1TAB_E	Chain E, Structure Of The Trypsin-Binding Domain Of Bov	461	461	85%	9e-163	99%	S P
1C1S_A	Chain A, Recruiting Zinc To Mediate Potent, Specific Inhib	460	460	85%	3e-162	99%	S

Lampiran 8

Hasil *alignment* sampel sekuen gen tripsin kation dengan sekuen yang terdapat pada *database Gene Bank*

```
> ref|NM_00113727.1| UGM nos taurus cationic trypsin [LOC780933], mRNA
gb|U0134787.1| UGM nos taurus cationic trypsin, mRNA (cDNA clone MGC:157392 IMAGE:2632590),
complete cds
length=478

Gene ID: 780933 LOC780933 | cationic trypsin (nos taurus)
(Over 10 PubMed links)

Score = 1351 bits (731), expect = 0.0
identities = 737/740 (99%), Gaps = 0/740 (0%)
strand=plus/plus

Query 11  CCATGAAGACCTTCATCTTTCCTGGCTCTCTGGGAGCCCGCTGCTTCCCCGCGGAGCG 70
      |||
Sbjct 29  CCATGAAGACCTTCATCTTTCCTGGCTCTCTGGGAGCCCGCTGCTTCCCCGCGGAGCG 98

Query 31  ATGATGACAAAGCTCTGGGCGGCTACACCTGCGGGCCAAATAGTGCCTTACCAAGTGT 130
      |||
Sbjct 49  ATGATGACAAAGCTCTGGGCGGCTACACCTGCGGGCCAAATAGTGCCTTACCAAGTGT 148

Query 131  CCCGTGAACCTCTGGCTACCACTTCTGGGGGGGCTCCCTCATCAAGCCAGTGGGTGGTGT 180
      |||
Sbjct 149  CCCGTGAACCTCTGGCTACCACTTCTGGGGGGGCTCCCTCATCAAGCCAGTGGGTGGTGT 208

Query 181  CTGGGGCTCATCTGCTACAACTCCGGAAATCCAAAGTGCCTCTGGGAGAAAGCAACATTAATG 230
      |||
Sbjct 209  CTGGGGCTCATCTGCTACAACTCCGGAAATCCAAAGTGCCTCTGGGAGAAAGCAACATTAATG 268

Query 251  TCGTTGAGGGCAATGAGCAATTGATCAGCCGATCCAAAGGATCTGCTCATCCCACTACCA 310
      |||
Sbjct 269  TCGTTGAGGGCAATGAGCAATTGATCAGCCGATCCAAAGGATCTGCTCATCCCACTACCA 328

Query 311  ACTCAAAACACTTAAACAAAGACCTCATCTGATTAAGTGAATCAGCTGCCAGTCTCA 370
      |||
Sbjct 329  ACTCAAAACACTTAAACAAAGACCTCATCTGATTAAGTGAATCAGCTGCCAGTCTCA 388

Query 371  ACAGCCGAGTAGCCCTCATCTCTCTGCCAACTCTCTGGCTCTGCTGGCACCAGTGTCT 430
      |||
Sbjct 389  ACAGCCGAGTAGCCCTCATCTCTCTGCCAACTCTCTGGCTCTGCTGGCACCAGTGTCT 448

Query 431  TCATCTCTGGCTGGGGCAACACCAAAAGCAGTGGCACCAGCTACCCCTGATGTCCTGAAAT 490
      |||
Sbjct 449  TCATCTCTGGCTGGGGCAACACCAAAAGCAGTGGCACCAGCTACCCCTGATGTCCTGAAAT 508

Query 491  GTCGTGAAGGCTCCCATCCCTATCAGACAGCTCTTGCAAAAGTGCCTACCCAGGGCCAGATCA 550
      |||
Sbjct 509  GTCGTGAAGGCTCCCATCCCTATCAGACAGCTCTTGCAAAAGTGCCTACCCAGGGCCAGATCA 568

Query 551  CCAACCAAGTGTCTGCTGGGCTACCTGGAGGGCGGAAAGGACTCCTGCCAGGGTGAAT 610
      |||
Sbjct 569  CCAACCAAGTGTCTGCTGGGCTACCTGGAGGGCGGAAAGGACTCCTGCCAGGGTGAAT 628

Query 611  CCGGTGGCCCTGTGGTCTGCAGTGGAAAGCTCCAGGGCATTGTCTCGGGGCTCTGGCT 670
      |||
Sbjct 629  CCGGTGGCCCTGTGGTCTGCAGTGGAAAGCTCCAGGGCATTGTCTCGGGGCTCTGGCT 688

Query 671  GCGCTCAGAAAAAAGAGCTCTGTCTACACCAAGGCTCTGCACCTACCTGAGCTGGATTA 730
      |||
Sbjct 689  GCGCTCAGAAAAAAGAGCTCTGTCTACACCAAGGCTCTGCACCTACCTGAGCTGGATTA 748

Query 731  AGCAGACCATCGCCCTCCAAAC 750
      |||
Sbjct 749  AGCAGACCATCGCCCTCCAAAC 768
```

## Lampiran 9

### Hasil translasi sampel sekuen gen tripsin kation ke dalam asam amino menggunakan program Bioedit versi 7.0.9

```
>pGEM-T Easy Tripsin kation
```

1	AAT TTC GGC GCC	ATG	AAG ACC TTC ATC TTT CTG GCT CTC TTG GGA	45
1	Asn Phe Gly Ala	Met	Lys Thr Phe Ile Phe Leu Ala Leu Leu Gly	15
46	GCC GCT GTT GCT TTC CCC GTG GAC GAT GAT GAC AAG GTC GTG GGC			90
16	Ala Ala Val Ala Phe Pro Val Asp Asp Asp Asp Lys Val Val Gly			30
91	GGC TAC ACC TGT GGG GCA AAT ACT GTC CCC TAC CAA GTG TCC CTG			135
31	Gly Tyr Thr Cys Gly Ala Asn Thr Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu			45
136	AAC TCT GGC TAC CAC TTC TGC GGG GGC TCC CTC ATC AAC AGC CAG			180
46	Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser Gln			60
181	TGG GTG GTG TCT GCG GCT CAC TGC TAC AAG TCC GGA ATC CAA GTG			225
61	Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Gly Ile Gln Val			75
226	CGT CTG GGA GAA GAC AAC ATT AAT GTC GTT GAG GGC AAT GAG CAA			270
76	Arg Leu Gly Glu Asp Asn Ile Asn Val Val Glu Gly Asn Glu Gln			90
271	TTC ATC AGC GCA TCC AAG AGC ATC GTC CAT CCC AGC TAC AAC TCA			315
91	Phe Ile Ser Ala Ser Lys Ser Ile Val His Pro Ser Tyr Asn Ser			105
316	AAC ACC TTA AAC AAC GAC GTC ATG CTG ATT AAA CTG AAA TCA GCT			360
106	Asn Thr Leu Asn Asn Asp Val Met Leu Ile Lys Leu Lys Ser Ala			120
361	GCC AGT CTC AAC AGC CGA GTA GCC TCT ATC TCT CTG CCA ACA TCC			405
121	Ala Ser Leu Asn Ser Arg Val Ala Ser Ile Ser Leu Pro Thr Ser			135
406	TGT GCC TCT GCT GGC ACC CAG TGT CTC ATC TCT GGC TGG GGC AAC			450
136	Cys Ala Ser Ala Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn			150
451	ACC AAA AGC AGT GGC ACC AGC TAC CCT GAT GTC CTG AAG TGT CTG			495
151	Thr Lys Ser Ser Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Val Leu Lys Cys Leu			165
496	AAG GCT CCC ATC CTA TCA GAC AGC TCT TGC AAA AGT GCC TAC CCA			540
166	Lys Ala Pro Ile Leu Ser Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ala Tyr Pro			180
541	GGC CAG ATC ACC AGC AAC ATG TTC TGT GCG GGC TAC CTG GAG GGC			585
181	Gly Gln Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly			195
586	GGA AAG GAC TCC TGC CAG GGT GAC TCC GGT GGC CCT GTG GTC TGC			630
196	Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys			210
631	AGT GGA AAG CTC CAG GGC ATT GTC TCC TGG GGC TCT GGC TGC GCT			675
211	Ser Gly Lys Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Gly Cys Ala			225
676	CAG AAA AAC AAG CCT GGT GTC TAC ACC AAG GTC TGC AAC TAC GTG			720
226	Gln Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Asn Tyr Val			240
721	AGC TGG ATT AAG CAG ACC ATC GCC TCC AAC CAT CAC CAT CAC CAT			765
241	Ser Trp Ile Lys Gln Thr Ile Ala Ser Asn His His His His His			255
766	CAC	TAA	CCC GGG CAA	780
256	His	End	Pro Gly Gln	